

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

**“Estudio de la Bioadsorción de Cadmio y Plomo
con Biomasa de *Serratia marcescens* M8a-2T, a
Nivel de Laboratorio.”**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

AUTOR

Susana Mónica Gutiérrez Moreno

ASESOR

Abad Flores Paucarima

Lima – Perú

2015

Hace 200 años un hombre oscuro, llamado Leewenhöek, curioseó por primera vez en un nuevo y misterioso mundo, poblado por millares de especies diferentes de seres diminutos algunos de ellos feroces y capaces de ocasionar la muerte; otros beneficiosos y en su mayoría más importantes para la humanidad que cualquier continente o archipiélago.

Paul de Kruiff, 1926
Cazadores de microbios

DEDICATORIAS

A DIOS TODOPODEROSO Y ETERNO

A MIS PADRES

A MIS DOS AMORES: MI ESPOSO Y MI HIJO

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a:

Los señores miembros del Jurado Informante, por las sugerencias que permitieron mejorar el borrador de la tesis.

A mi asesor, el Dr. Abad Flores, por las sugerencias constructivas y la motivación constante para la obtención del presente grado.

Al Dr. Lenin Maturrano quien llevó el *pellet* de la biomasa a la Universidad de Alicante en España para hacer la micrografía electrónica.

Al VRI por el financiamiento otorgado a los proyectos CON CON 101001071 (2010), CON CON 111001201 (2011) y CON CON 131001251 (2013) que pasó a ser el soporte económico de la parte experimental de la tesis, sobretodo, para cubrir el costo de la determinación de cadmio y plomo por espectrometría de absorción atómica.

A IQ Farma por la donación de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

A todos los estudiantes y tesisas, miembros del laboratorio de Microbiología y Biotecnología microbiana, por todo el apoyo recibido durante el desarrollo de la parte experimental y porque si comienzo a individualizar sus nombres la lista sería demasiado larga. Muchísimas gracias por ser parte de mi familia sanmarquina.

| CONTENIDO | pág |
|---|-----|
| I Introducción | 1 |
| II Marco teórico | 5 |
| II.1 Metales pesados | 5 |
| II.1.1 Cadmio | 7 |
| II.1.2 Plomo | 9 |
| II.1.3 Mecanismos de resistencia a los metales pesados | 13 |
| II.2 Biorremediación | 15 |
| II.2.1 Biosorción de metales por medio de microorganismos | 16 |
| II.2.1.1 Sorción o adsorción | 16 |
| II.2.1.2 Modelos de sorción en equilibrio | 19 |
| II.3 <i>Serratia marcescens</i> | 20 |
| III. Hipótesis | 25 |
| IV. Objetivos | 25 |
| IV.1 Objetivo General | 25 |
| IV.2 Objetivos específicos | 25 |
| V. Material | 26 |
| V.1 Material biológico | 26 |
| VI. Métodos | 26 |
| VI.1 Reactivación de las cepas | 26 |
| VI.2 Preparación del inóculo para la prueba de sensibilidad a metales pesados | 26 |
| VI.3 Determinación de la resistencia a metales pesados | 27 |
| VI.4 Naturaleza física de la resistencia a metales pesados | 27 |
| VI.5 Cinética de crecimiento | 28 |

| | |
|---|----|
| VI.6 Obtención de biomasa | 28 |
| VI.7 Secado de biomasa | 29 |
| VI.8 Determinación de la concentración óptima de biomasa | 29 |
| VI.9 Determinación de pH óptimo | 29 |
| VI.10 Determinación del tiempo óptimo de enfrentamiento | 30 |
| VI.11 Efecto de las concentraciones iniciales de cadmio y plomo sobre la capacidad de biosorción | 30 |
| VI.12 Efecto de la granulometría en la capacidad de biosorción | 31 |
| VI.13 Determinación de la constante de equilibrio | 31 |
| VI.14 Medición de la concentración de metales pesados | 32 |
| VI.15 Microscopia electrónica | 33 |
| VI.16 Identificación molecular de la cepa elegida | 33 |
| V.17 Análisis estadísticos | 34 |
| VII. RESULTADOS | 35 |
| VII. 1 Reactivación de cepas | 35 |
| VII.2 Determinación de la resistencia a metales pesados | 35 |
| VII.3 Cinética de crecimiento | 40 |
| VII.4 Naturaleza genética de la resistencia a los metales pesados | 48 |
| VII.5 Determinación del pH óptimo para la remoción de plomo y cadmio | 49 |
| VII.6 Determinación del tiempo óptimo de enfrentamiento para la remoción de cadmio y plomo | 52 |
| VII.7 Efecto de la concentración inicial de cadmio y plomo | 55 |
| VII.8 Determinación de la concentración óptima de biomasa | 57 |
| VII.9 Efecto de la granulometría en la capacidad de biosorción | 57 |
| VII.10 Determinación de la constante de equilibrio | 60 |
| VII.11 Identificación molecular de la cepa M8A-2T | 62 |
| VII.12 Microscopía electrónica de <i>Serratia marcescens</i> M8A-2T | 65 |
| VIII. DISCUSION | 67 |
| VIII.1 Determinación de la resistencia a metales pesados | 67 |
| VIII.2 Cinética de crecimiento | 68 |
| VIII.3 Determinación de pH óptimo | 69 |
| VIII.4 Determinación del tiempo óptimo de enfrentamiento | 70 |

| | |
|---|----|
| VIII.5 Efecto de la concentración inicial de cadmio y plomo sobre la capacidad de biosorción | 71 |
| VIII.6 Determinación de la concentración óptima de biomasa | 72 |
| VIII.7 Efecto de la granulometría en la capacidad de biosorción | 73 |
| VIII.8 Determinación de la constante de equilibrio | 73 |
| VIII.9 Microscopía electrónica | 74 |
| IX. CONCLUSIONES | 75 |
| X. RECOMENDACIONES | 76 |
| XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 77 |

| ÍNDICE DE TABLAS | Pág |
|---|-----|
| Tabla 1. Determinantes genéticos de resistencia a metales pesados ubicados en cromosoma | 14 |
| Tabla 2. Capacidad máxima de sorción de algunas cepas bacterianas | 20 |
| Tabla 3. Patrones de resistencia frente a los metales pesados ensayados | 39 |
| Tabla 4. Medición de los halos de inhibición en mm para Cd (II) y Pb (II) | 39 |
| Tabla 5. Resumen de los datos de producción de biomasa | 48 |
| Tabla 6. Prueba de ANOVA para la remoción de cadmio a diferentes pH | 50 |
| Tabla 7. Prueba Pos análisis de Tukey para la remoción de cadmio a diferentes pH | 51 |
| Tabla 8. Prueba de ANOVA para la biosorción de plomo a diferentes pH | 52 |
| Tabla 9. Prueba pos análisis de Tukey para la remoción de plomo según el pH | 52 |
| Tabla 10. Prueba de ANOVA para la biosorción de cadmio vs tiempo | 53 |
| Tabla 11. Prueba de ANOVA para la biosorción de plomo vs tiempo | 54 |
| Tabla 12. Prueba pos análisis de Tukey para la remoción de plomo vs tiempo | 54 |
| Tabla 13. Prueba de ANOVA para la remoción de cadmio según la concentración inicial de metales | 55 |
| Tabla 14. Prueba pos análisis de Tukey para la remoción de cadmio y concentración inicial de metales | 55 |
| Tabla 15. Prueba de ANOVA para la remoción de plomo según concentración inicial de metal | 56 |
| Tabla 16. Prueba pos análisis de Tukey para la remoción de plomo según concentración inicial de metal | 56 |
| Tabla 17. Porcentaje de remoción de cadmio en función de la concentración de biomasa | 57 |
| Tabla 18. Porcentaje de remoción de plomo en función de la concentración de biomasa | 57 |
| Tabla 19. Medidas (en mm) de los diferentes tamaños de grano de la biomasa seca | 59 |
| Tabla 20. Porcentaje de remoción de cadmio según granulometría de biomasa | 59 |
| Tabla 21. Porcentaje de remoción de plomo según granulometría de biomasa | 59 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Tipos de isoterma de Langmuir | 19 |
| Figura 2. Porcentaje de cepas resistentes y sensibles a los diferentes metales pesados en las máximas concentraciones probadas | 35 |
| Figura 3. Comportamiento de las cepas frente a 80 000ppm de zinc | 36 |
| Figura 4. Comportamiento de las cepas frente a 16 000 ppm de níquel | 36 |
| Figura 5. Comportamiento de las cepas frente a 36 000 ppm de cromo | 37 |
| Figura 6. Comportamiento de las cepas frente a 800 ppm de cadmio | 37 |
| Figura 7. Comportamiento de las cepas frente a 32 000 ppm de plomo | 38 |
| Figura 8. Comportamiento de las cepas frente a 500 ppm de mercurio | 38 |
| Figura 9. Cinética de crecimiento de la cepa XV | 40 |
| Figura 10. Linealización de la fase logarítmica de la cepa XV | 40 |
| Figura 11. Cinética de crecimiento de la cepa XXXIV | 41 |
| Figura 12. Linealización de la fase logarítmica de la cepa XXXIV | 41 |
| Figura 13. Cinética de crecimiento de la cepa XXII | 42 |
| Figura 14. Linealización de la fase logarítmica de crecimiento de la cepa XXII | 42 |
| Figura 15. Cinética de crecimiento de la cepa XIX | 43 |
| Figura 16. Linealización de la fase logarítmica de la cepa XIX | 43 |
| Figura 17. Cinética de crecimiento de la cepa VII | 44 |
| Figura 18. Linealización de la fase logarítmica de la cepa VII | 44 |
| Figura 19. Cinética de crecimiento de la cepa M5A-4S | 45 |
| Figura 20. Linealización de la fase logarítmica de la cepa M5A-4S | 45 |
| Figura 21. Cinética de crecimiento de la cepa 1 10 | 46 |
| Figura 22. Linealización de la fase logarítmica de la cepa 1 10 | 46 |
| Figura 23. Cinética de crecimiento de la cepa M8A-2T | 47 |
| Figura 24. Linealización de la fase logarítmica de la cepa M8A-2T | 47 |
| Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa para determinar presencia de plásmidos | 48 |
| Figura 26. Efecto del pH sobre la biosorción de cadmio de la cepa M8A-2T | 50 |
| Figura 27. Efecto del pH sobre la biosorción de plomo de la cepa M8A-2T | 51 |
| Figura 28. Efecto del tiempo sobre la biosorción de cadmio de la cepa M8A-2T | 53 |
| Figura 29. Efecto del tiempo sobre la biosorción de plomo de la cepa M8A-2T | 54 |

| | |
|--|----|
| Figura 30. Efecto de la concentración inicial de cadmio sobre la biosorción de la cepa M8A-2T | 55 |
| Figura 31. Efecto de la concentración inicial de plomo sobre la biosorción de la cepa M8A-2T | 56 |
| Figura 32. Diferentes tamaños de partícula observados en la biomasa | 58 |
| Figura 33. A) Observación microscópica de los granos pequeños B) de granos medianos y C) de granos grandes | 58 |
| Figura 34. Cinética de biosorción de cadmio | 60 |
| Figura 35. Isotherma de Langmuir para biosorción de Cd por la cepa M8A-2T | 61 |
| Figura 36. Cinética de biosorción de plomo | 61 |
| Figura 37. Isotherma de Langmuir para biosorción de Pb por la cepa M8A-2T | 62 |
| Figura 38. Árbol filogenético de confirmación de la cepa M8A-2T como <i>Serratia marcescens</i> M8A-2T | 64 |
| Figura 39. Micrografía electrónica de la cepa <i>Serratia marcescens</i> M8A-2T mostrando los iones de plomo adheridos a la superficie bacteriana | 65 |
| Figura 40. Corte sagital de la cepa <i>S. marcescens</i> M8A-2T donde observamos iones de plomo rodeando la membrana externa de la pared celular bacteriana (73,000 x) | 66 |

RESUMEN

Las fuentes más comunes de contaminación ambiental son las refinerías de petróleo, plantas de generación de energía eléctrica, los procesos metalúrgicos y las plantas de tratamiento de efluentes cuyos desechos ingresan indirectamente a las aguas de los ríos, lagunas, océanos y suelos. Frente a este problema la biotecnología está tratando de presentar alternativas de bajo costo y fáciles de implementar, como la biodegradación de hidrocarburos, la remoción de metales pesados empleando desechos agroindustriales, organismos vivos de origen animal, vegetal, microbiano, fúngico o algal, etc.

Con la finalidad de seleccionar una cepa que pueda servir como biosorbente microbiano, se reactivaron 122 cepas aisladas en ambiente minero, a las que se les probó la resistencia a metales pesados, velocidad de crecimiento y capacidad de producción de biomasa. En base a estos parámetros se seleccionó la cepa de *Serratia marcescens* M8A-2T para optimizar los parámetros físico químicos de remoción de cadmio y plomo, la naturaleza física y genética de la resistencia así como la confirmación de la identificación de la cepa empleando el gen del RNAr 16S.

Se obtuvieron 27 cepas resistentes a metales pesados; 2 cepas resistieron hasta 80000 ppm de zinc, 20 cepas a 16 000 ppm de níquel, 1 cepa a 36 000 ppm de cromo, 23 cepas a 800 ppm de cadmio y 80 cepas a 32 000 ppm de plomo. *S. marcescens* no presentó plásmidos en la electroforesis en gel de agarosa y en la microscopía electrónica de transmisión se pudo observar que el metal se adhería a la superficie bacteriana, por lo tanto el proceso de remoción es de bioadsorción.

La biomasa logró remover 99,97 % de cadmio a pH 3 y 96 % de plomo a pH 7, después de 60 minutos de enfrentamiento con 100 ppm de cada uno de los metales. La remoción fue independiente de la concentración inicial de metal y operó muy bien con biomasa de granulometría menor a 50 μm y 1 mg/ml de concentración.

Para conocer la máxima capacidad de retención (Q_{max}) se usaron las isotermas de Langmuir resultando que la cepa en estudio tiene un Q_{max} de 417 mg de cadmio / g y de 357 mg de plomo / g , en 15 minutos, y se ajustó en 98,3 % al modelo de Langmuir.

Estos resultados, indican que la cepa es apta para ser empleada en procesos de bioadsorción de cadmio y plomo y que el proceso está optimizado para su escalamiento a nivel piloto.

Palabras clave: bioadsorción, biomasa, cadmio, optimización, plomo

ABSTRACT

The most common sources of pollutants are the oil refineries, electric energy generation plants, metallurgical processes and effluent treatment plants. They spoil their wastewater contaminants and let them enter to water supplies of soils and groundwater systems. Being mining the most important among them. Facing this problem, biotechnology gives us alternatives like hydrocarbon biodegradation, heavy metal remotion by means of a low cost-effective treatment and easy to implement; using agroindustrial wastes, animal, plants, microbial, fungal or algal beings.

With the goal to select a strain that could be used as microbial biosorbent, we evaluated 122 strains isolated in a mining environment. They were tested for heavy metal resistance, rate of growth and biomass production ability. The *Serratia marcescens* M8A-2T strain was selected to be tested for its biosorption ability, the physic-chemical parameters for optimization of cadmium and lead removal, the genetic and physical heavy metal resistance nature and the taxonomic identification by using the 16S rRNA gene. There were 27 heavy metal resistant strains; 2 of them resisted to 80 000 ppm of zinc, 20 to 16 000 ppm of nickel, 1 to 36 000 ppm of chromium, 23 to 800 ppm de cadmium and 80 to 32 000 ppm of lead. *S. marcescens* did not show plasmids in the electrophoresis agarose gel. In the transmission electronic microscopic method lead was attracted to the bacterial surface, because of this the process could be named bioadsorption.

Furthermore, the biomass at pH 3 got to remove 99,97 % of cadmium and 96 % of lead at pH 7 after 60 minutes against 100 ppm of Cd and Pb, respectively. In 15 minutes most of the metal concentration in the solution is retained by the strain, 91,70 % of cadmium and 77,58 % of lead. The biosorption capacity was no dependent from the metal initial concentration and 1 mg/ml of biomass with granus size less than 50 μm were appropriate to remove Cd and Pb. To know the sorption ability the Langmuir isotherms were used. The strain presented an Q_{max} of 417mg cadmium/g and 357mg/ml lead /g and it fitted with Langmuir model about 98,3 % .

These results mean the bacterial biomass could be used in cadmium and lead bioadsorption process and it could be scaled to pilot level.

Key Words: bioadsorption, biomass, cadmium, optimization, lead

I. INTRODUCCIÓN

La rápida industrialización y urbanización de las grandes ciudades han conducido a un incremento en la deposición de desechos conteniendo metales pesados al ambiente debido a la descarga de efluentes industriales sin tratamiento. Los metales pesados son tóxicos, existen como iones en soluciones acuosas pudiendo ser absorbidos por las plantas y el cuerpo humano (Wong *et al*, 2003). El plomo y el cadmio son dos metales que tienen mayor importancia porque la exposición a ellos causa daño al hígado, riñones, intestinos, retardo mental en niños, bronquitis y cáncer a la médula (Alluri *et al*,2007).

Los metales pesados están involucrados directa o indirectamente en gran parte de las actividades humanas, especialmente en los sectores industriales, agrícolas, mineros y urbanos; aumentando la concentración de iones metálicos en los sistemas bióticos terrestres, acuáticos y aéreos. Esto es uno de los principales problemas ambientales a nivel nacional y mundial, debido a que su acumulación y biomagnificación a través del tiempo afecta a toda la cadena trófica en un ecosistema.

En el 2008, la producción primaria mundial de cadmio aumentó a 19 600 TM; la mayoría del cadmio primario del mundo se estaba produciendo en Asia y el Pacífico, específicamente en China, Japón y la República de Corea, seguidos por Europa Central, Eurasia, América del Norte y Europa Occidental. La producción mundial de cadmio secundario representó aproximadamente el 20% del total de la producción de metales de cadmio, y se espera que este porcentaje aumente en el futuro. La mayoría de metales secundarios se han fabricado con níquel-cadmio (Ni Cd) del reciclaje de baterías. Había tres grandes programas de recolección y reciclaje de Ni Cd en el mundo, la Corporación de reciclaje de baterías recargables (RBRC), programa en los Estados Unidos y Canadá, la Asociación de baterías de Japón y el programa Collect Ni Cd en Europa.

La producción mundial de cadmio refinado conforme al último reporte de la U .S. GEOLOGICAL SURVEY MINERAL YEARBOOK del año 2008, arroja como mayor

productor en el año 2008 a China con 4 300 TM, seguido de la República de Corea del Sur, con 2 900 TM, luego de Japón con 2 116 TM y muy de cerca por Kazajistán y un poco más alejado México con 1 605 TM y Perú con 371 TM, éstos dos últimos como parte de los países de América Latina y el Caribe; se observa también una pequeña producción en Europa y Australia, mientras que en África la producción de cadmio siempre fue muy pequeña y ha desaparecido prácticamente.

Por otro lado, el plomo es extraído en más de 40 países, siendo los principales productores China y Australia, que representan alrededor del 30 % y 22 % de la producción minera mundial, respectivamente, minerales ricos en plomo se producen con mayor frecuencia junto con otros metales y cerca de dos tercios de la producción de plomo en todo el mundo se obtiene a partir de minerales mixtos de plomo y zinc. La producción total mundial de plomo de las minas ha disminuido ligeramente, pasando de 3,6 millones de toneladas en 1975 a 3,1 millones de toneladas en 2004. Durante el mismo período, la producción mundial de plomo refinado y el consumo de este metal han aumentado de alrededor de 4,7 millones de toneladas a alrededor de 7,1 millones de toneladas. La razón de la diferencia entre la producción y el consumo de las minas de plomo se debe al reciclado de plomo que es cada vez más importante por la oferta existente, se sabe que el reciclaje alcanzó el 45 por ciento del suministro mundial en el año 2003 (PNUMA,2010).

La empresa Doe Run, en la ciudad de La Oroya, en el año 2000 realizó un programa de monitoreo de plomo en sangre en la población adyacente a sus instalaciones y un programa de capacitación en prevención de salud con el objetivo de determinar los niveles de plomo. Sobre una muestra de 5 062 personas entre niños (con el consentimiento de sus padres) y adultos (voluntariamente) ,el resultado promedio general de plomo en sangre de acuerdo a este estudio fue de 17,7 ug/100 ml, en tanto que para la población más cercana al complejo metalúrgico se obtuvo un promedio de 25,7 ug/100 ml, para una población de 1 198 personas, encontrando los picos más altos en el rango de edad de 0 – 3 años con 36,7 ug/100 ml y de 4 – 6 años con 32,9 ug/100 ml. Siendo los niveles normales de plomo sanguíneo menos de 20 ug/100 ml para adultos y menos de 5 ug/ml para niños. No obstante estos

resultados evidenciaban ciertas mejoras comparados con los resultados de un estudio similar en años anteriores (MINSA, 2001).

Ante esta problemática es necesario conocer formas de disminuir la contaminación en los ecosistemas pues afecta directamente a la población que vive en las cercanías de los asentamientos mineros. Los métodos para el tratamiento de aguas residuales con metales incluyen: precipitación, oxidación, reducción, intercambio iónico, filtración, tratamiento electroquímico, tecnologías de membrana y recuperación por evaporación, resultan costosos e ineficientes, especialmente cuando la concentración de los metales es muy baja (Volesky, 1990). Los métodos químicos para la eliminación de metales pesados también resultan costosos debido a que el agente activo no puede ser recuperado para su posterior reutilización. Además, el producto final es un lodo con alta concentración de metales lo que dificulta su eliminación y por ello propone a los microorganismos y sus productos como bioacumuladores eficientes de metales solubles y particulados, especialmente a partir de concentraciones externas diluidas (Cañizares, 2000).

La biotecnología ha separado dos grandes áreas dentro del mismo objetivo: bioacumulación y biosorción. La primera es considerada como un proceso activo de eliminación de metales pesados mediante mecanismos metabólicos involucrando biomasa viva, mientras que biosorción es entendido como un proceso pasivo con mecanismos netamente físicoquímicos, por medio de biomasa muerta. Por tanto, la biosorción es un área de investigación con muchos aportes a la comunidad industrial, por ser una alternativa técnica y económicamente viable, tanto por su capacidad de depuración como por el moderado costo de operación que tiene, y por ser considerada una tecnología “limpia” en la eliminación de metales pesados de aguas residuales o de desecho de actividades productivas (Martin, 2008).

El estudio de las variables pH, concentración de iones, presencia de electrólitos, concentración y tratamiento de biomasa son significativas en la biosorción de iones Pb^{2+} , Cd^{2+} y Cr^{3+} en solución cuando se usa biomasa no viva de *Saccharomyces cerevisiae* (Rodríguez *et al.* 2008).

El uso de materiales biológicos como adsorbentes es interesante debido a la diversidad de sitios de sorción, baja susceptibilidad de interferencia de este proceso, capacidad de sorción semejante a materiales sintéticos, abundancia de recursos naturales y bajo costo (Gonzales *et al.* 2008).

En nuestro país es notable la contaminación de los ríos Mantaro, Huallaga y la cuenca del río Rímac entre otros. Es por este motivo, que nos planteamos la necesidad de producir un biosorbente microbiano a partir de bacterias nativas aisladas en ecosistemas contaminados, como los relaves mineros, que no deben causar contaminación adicional y deben adherir en su superficie a los metales pesados en intervalos relativamente cortos para poder reutilizarse, recuperándose los metales en su forma elemental y no generando lodos que constituyan nuevos pasivos ambientales; como los lodos de cal por ejemplo (Nina, 2008).

Esta tesis contribuye con el estudio de las “tecnologías limpias” empleando cepas nativas y propone un proceso optimizado cuya finalidad es disminuir y solucionar la contaminación ambiental ocasionada por las actividades humanas que permita recuperar ecosistemas contaminados con metales pesados, para que los cuerpos de agua natural no constituyan un problema de salud para las poblaciones cercanas a los asentamientos mineros.

El tema es de mucha importancia y actualidad debido a que nuestro planeta está atravesando un acelerado proceso de cambio climático impulsado por los contaminantes provenientes de la actividad industrial en general y minera en particular.

II. MARCO TEÓRICO

II.1 METALES PESADOS

Los metales pesados son elementos químicos con densidades superiores a 5 gr/cm³, pesos atómicos mayores a 44,956 y números atómicos superiores a 20, excepto los elementos de los grupos alcalino, alcalinotérreo, lantánidos y actínidos. Los metales pesados se pueden clasificar en esenciales (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn, V), los cuales cumplen alguna función biológica a concentraciones traza y en no esenciales (Cr, Cd, Hg, Pb, As, Sb), cuando no cumplen ninguna función biológica conocida.

Los iones metálicos son parte de la geósfera, por lo tanto se encuentran presentes de forma natural en la corteza terrestre (yacimientos) y son extraídos por el hombre para su fundición y posterior uso industrial. Las principales causas de acumulación natural en los ecosistemas son: la erosión, la actividad volcánica y los incendios forestales, que de la misma manera cumplen ciclos de acumulación y remediación, sin presentarse un efecto toxico y/o nocivo para los ecosistemas.

El proceso de transformación de los metales pesados abarca desde su extracción en los yacimientos, hasta la fundición y el refinado de éstos, para obtener los metales de interés y convertirlos en bienes de consumo, que una vez utilizados son desechados. En cada una de estas etapas se liberan metales al ambiente; así, la minería expone las rocas metálicas a meteorización acelerada, lixiviación y escorrentía; la fundición y el refinado, liberan importantes cantidades de productos secundarios. Las descargas de las industrias de aplicación, transformación, residuos sólidos urbanos y lodos procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, contienen una importante carga de diferentes iones metálicos. El aporte atmosférico se da principalmente por la combustión de materias primas energéticas fósiles como carbón, gasolina, etc. (Mejía, 2006).

Por lo tanto las actividades humanas son las principales causantes de la contaminación producida por la acumulación de estos elementos. Debido a sus características especiales, los metales pesados se convierten en potentes contaminantes ambientales. Algunas de estas características son: su estabilidad, lo cual los hace persistentes y residuales en los ecosistemas, la afinidad por grupos tiólicos ($-SH-$), presentes en la mayoría de las enzimas de cualquier organismo vivo, la biodisponibilidad en medio acuoso y la capacidad de bioconcentrarse en los organismos acuáticos (peces, crustáceos, algas, etc.) y terrestres (plantas), afectando toda la cadena alimenticia de los ecosistemas (Cortuelo, 1999).

Los metales pesados en los ecosistemas pueden ser detectados en su estado natural o complejados con sales. En las aguas superficiales pueden existir en forma de coloides y/o partículas, apareciendo como hidróxidos, óxidos, silicatos, sulfuros o adsorbidos en minerales del grupo de las arcillas, sílice y materia orgánica. También se pueden encontrar en fase disuelta (debido a la baja solubilidad de estos elementos, las concentraciones presentadas son muy bajas en forma iónica o complejos organometálicos), la cual es dependiente del pH, del tipo de sorbentes en los que se encuentran adsorbidos, y por último del estado de oxidación de las fases minerales y el ambiente redox del sistema (Mejía, 2006).

Los alimentos contaminados con metales pesados pueden dañar a humanos y animales aún en bajas concentraciones debido a su acumulación gradual, se ha demostrado la acumulación de iones metálicos (Hg, Cr, Cd, Pb, As, V) en tejido sanguíneo de madres en gestación, en células de cerebro, hígado, riñón, corazón, páncreas, tejido muscular y huesos; formando complejos con unos péptidos llamados metalotieneinas. También se comprobó el efecto genotóxico en plantas como *Tradescantia* y *Arabidopsis* expuestas a As, Pb, Hg, Cd y Cr. En el Japón hay cuatro enfermedades causadas por la polución, Itai itai, Minamata, Niigata Minamata, y asma Yokkaichi; las tres primeras son causadas por metales pesados como cadmio y metil mercurio (Mejía, 2006).

II.1.1 Cadmio

Es un metal pesado, blanco azulado, relativamente poco abundante. Es uno de los metales más tóxicos. Este metal conjuntamente con el plomo y el mercurio forman el denominado “*big three*” de los metales pesados (Volesky, 1990). Su estado de oxidación más común es el +2. Puede presentar el estado de oxidación +1, pero es muy inestable.

El único mineral que contiene sólo cadmio como metal es la *greenockita* (CdS), aunque es difícil de encontrar. No obstante, es frecuente que aparezcan pequeñas cantidades de su óxido revistiendo el silicato de Zn (hemimorfita) o su carbonato denominado octavita (CdCO₃) revistiendo la blenda. También se ha determinado cadmio en arcillas pizarrosas con concentraciones de 0,3 mg/kg (Fassett, 1980).

No se conoce que el cadmio tenga algún efecto beneficioso. Aunque las exposiciones prolongadas a este metal son extremadamente raras actualmente, la ingestión de altas dosis es causa de severas irritaciones del estómago, vómito y diarrea y su inhalación causa graves irritaciones en los pulmones (Berglund *et al.*, 1994).

Causan mayor preocupación los efectos de las exposiciones a concentraciones bajas de cadmio y a largo plazo. Algunos efectos de varios niveles y duraciones de exposición son los siguientes:

- En personas que han estado expuestas a un exceso de cadmio, en su dieta o por el aire, se ha observado un daño en los riñones. Esta enfermedad renal normalmente no es mortal, pero puede ocasionar la formación de cálculos y sus efectos en el sistema óseo se manifiestan a través de dolor y debilidad.
- En trabajadores de fábricas, en donde el nivel de concentración de cadmio en el aire es alto, han sido observados severos daños en los pulmones originando, incluso, enfisemas.

- En animales expuestos durante largos periodos al cadmio por inhalación, se ha observado la aparición de cáncer de pulmón (Takenaka *et al.*, 1983; Xu *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1999).

Estudios en seres humanos también sugieren que una inhalación prolongada de cadmio puede resultar en incrementar el riesgo de contraer cáncer pulmonar, como en el caso de los fumadores. Sin embargo, no hay evidencia de que la ingestión de cadmio por la vía oral sea causante de cáncer. Ha sido también observada presión arterial alta en animales expuestos al cadmio. Sin embargo, aún no se sabe si la exposición al cadmio desempeña un papel importante en la hipertensión humana. Otros tejidos también son dañados por exposición al cadmio incluyendo hígado, testículos, sistema inmunológico, sistema nervioso y sangre. Efectos negativos en la reproducción y el desarrollo han sido observados en animales expuestos al cadmio, pero no han sido reportados aún en seres humanos (Clarkson *et al.*, 1983; Elinder, 1986; WHO/IPCS, 1992; Nordberg, 1996).

La exposición al cadmio en los seres humanos se produce generalmente a través de dos fuentes principales: la primera es la vía oral (por agua e ingestión de alimentos contaminados). La segunda vía es por inhalación, la población fumadora es la más expuesta al cadmio, porque los cigarrillos lo contienen (Nordberg *et al.*, 1985; Jarup *et al.*, 1998).

Algunos órganos vitales son blancos de la toxicidad del cadmio. En organismos sobreexpuestos, el cadmio ocasiona graves enfermedades al actuar sobre dichos órganos. Existen actualmente algunas descripciones de posibles mecanismos de toxicidad del cadmio (Jarup *et al.*, 1998). Sin embargo, la implicación real que este elemento tiene como agente tóxico ha sido poco estudiada, por lo que es de gran importancia llevar a cabo estudios para profundizar en los factores de riesgo, con objeto de realizar medidas preventivas en la población.

Una vez absorbido, el cadmio es transportado por el torrente circulatorio hasta el hígado, en donde se une a una proteína de bajo peso molecular. Pequeñas

cantidades de ese complejo proteína-cadmio pasan continuamente del hígado al torrente sanguíneo, para ser transportado a los riñones y filtrado a través de los glomérulos, para posteriormente ser reabsorbido y almacenado en las células tubulares del riñón. Este último órgano excreta del 1 al 2 % del cadmio tomado directamente de las fuentes ambientales, lo que provoca una gran acumulación de cadmio en los riñones. La concentración del metal en el riñón es aproximadamente diez mil veces más alta que en el torrente sanguíneo. La excreción fecal del metal representa una mínima cantidad del cadmio no absorbido en el sistema gastrointestinal. Por otra parte, se estima que la vida biológica del cadmio en los humanos varía entre 13 y 40 años (Nordberg,1996; Nasruddin, 2002).

La producción anual de cadmio ronda las 20 000 toneladas (Volesky,1990). Aproximadamente tres cuartas partes del cadmio producido se emplea en la fabricación de baterías (especialmente en las baterías de níquel-cadmio). Otra parte importante se emplea en galvanoplastia (como recubrimiento). También algunas sales se emplean como pigmentos, por ejemplo, el sulfuro de cadmio se emplea como pigmento amarillo. Otro uso tiene lugar en aleaciones para cojinetes debido a su bajo coeficiente de fricción y muy buena resistencia (Cruz,2008).

II.1.2 Plomo

El plomo es un metal pesado de densidad $11,4 \text{ g/cm}^3$ a 16°C , de color azulado, que al empañarse adquiere un color gris mate. Es flexible, inelástico y se funde con facilidad. Su fundición se produce a $327,4^\circ\text{C}$, hirviendo a $1\,725^\circ\text{C}$. Sus valencias químicas normales son 2 y 4. Es relativamente resistente al ataque de ácido sulfúrico y ácido clorhídrico, aunque se disuelve con lentitud en ácido nítrico y ante la presencia de bases nitrogenadas. El plomo es anfótero, ya que forma sales de plomo de los ácidos, así como sales metálicas del ácido plúmbico. Tiene la capacidad de formar muchas sales, óxidos y compuestos organometálicos.

El plomo rara vez se encuentra en su estado elemental, obteniéndose básicamente de la galena (PbS) y, en menor proporción, de otros minerales de

plomo asociados a la galena y a los sulfuros complejos como la anglesita (PbSO_4), cerusita (PbCO_3), crocoita (PbCrO_4), etc (Martin,2008).

Los efectos de la intoxicación por plomo fueron descritos por Hipócrates en la antigua Grecia (Landrigan, 1990). Benjamin Franklin también describió el efecto de la ingesta de este metal entre los trabajadores de su imprenta, especialmente los que fabricaban y manipulaban los linotipos hechos de plomo. A pesar de tener referencias tan antiguas, el problema del plomo no se ha atendido como se debiera. Los textos de toxicología hasta la década de los setenta no dedicaban mayor atención a este problema.

Desde mediados de los años setenta, las autoridades de salud de los Estados Unidos reconocieron al envenenamiento por plomo en niños como un problema grave al que llamaron epidemia silenciosa. Este envenenamiento en niños se ha asociado a las superficies vidriadas como ventanas, puertas (Klein *et al.*, 1970) y pigmentos en determinadas pinturas (Copeland,1971). Una vez reconocido el problema, el creciente cuerpo de información sobre el daño del plomo a la salud ha llevado a las autoridades de salud a emitir normas cada vez más estrictas sobre los niveles de este metal en la sangre, mientras que las autoridades del medio ambiente prohibieron el uso de las pinturas basadas en plomo en 1978 y se empezó a sustituir paulatinamente el plomo en las gasolinas a partir de la década de los setenta. Al mismo tiempo, la Ley del Aire Limpio (Clean Air Act) señalaba límites máximos para la concentración del plomo en el aire (USEPA, 1986; NAS/NRC, 1993).

El plomo en la sangre puede provocar que un niño quede discapacitado de por vida. Hay estudios que han relacionado una baja de 5,8 puntos en las pruebas de coeficiente intelectual (donde 100 sería la habilidad de la mayoría de los niños), por cada diez microgramos por decilitro en la sangre de un niño (Carrington y Bolger, 1992; Rosen, 1992). El plomo también causa anemia en los niños y en los adultos al impedir la formación de moléculas que transportan el oxígeno.

Se cree que el uso generalizado que le daban al plomo en la antigua Roma (en recipientes, tubería, etc.) tuvo que ver con la decadencia de su civilización. Los romanos usaban incluso el acetato de plomo, por su dulzura, como edulcorante del vino, agudizando la intoxicación en quien lo bebía (Gilfillan, 1965; Volesky, 1990; Rosen, 1992; Graeme y Pollack, 1998).

Una vez absorbido en el cuerpo humano, el plomo se almacena en los huesos, riñones e hígado. La sangre constituye un almacén temporal que se usa en medicina para medir la exposición al plomo durante los últimos 30 días (NAS/NRC, 1993). En los adultos, la exposición a niveles sumamente bajos de plomo causa incrementos pequeños, pero significativos, en la presión arterial. También el plomo causa enfermedades renales y afecta la fertilidad. En los casos agudos, la alta presión arterial (hipertensión) causada por la exposición al plomo, contribuye a que mueran miles de personas cada año, especialmente personas entre las edades de 35 y 50 años (Ochiai, 1995; Needleman y col., 1996; Melman y col., 1998; Pirkle *et al.*, 1998). Se recomienda que el nivel de este metal pesado en sangre no sea mayor a 10 µg/dL de sangre, menos de 400 ppm en suelos donde jueguen niños, ausencia en agua potable (Poma, 2008).

El consumo anual de plomo es el orden de 3 millones de toneladas, de las cuales el 40 % se usa en la fabricación de acumuladores eléctricos y baterías. Otras aplicaciones importantes son: elementos de construcción (12 %), fabricación de forros para cables (6 %), pigmentos, soldadura suave, municiones, plumadas para pesca y también en la fabricación de soldaditos y otros juguetes (Volesky, 1990; NAS/NRC, 1993).

Se están desarrollando compuestos organoplúmbicos para aplicaciones como son la de catalizadores en la fabricación de espuma de poliuretano, tóxicos para las pinturas navales con el fin de inhibir la incrustación en los cascos, agentes biocidas contra las bacterias grampositivas, ácaros y otras bacterias que puedan invadir zonas íntimas, protección de la madera contra el ataque de los barrenillos y hongos marinos, preservadores para el algodón contra la descomposición y el moho,

agentes molusquicidas, agentes antihelmínticos, agentes reductores del desgaste en los lubricantes e inhibidores de la corrosión para el acero.

Merced a su excelente resistencia a la corrosión, el plomo encuentra un amplio uso en la construcción, en particular en la industria química (Sublet *et al.*, 2003). Es resistente al ataque por parte de muchos ácidos porque forma su propio revestimiento protector de óxido, pero es atacado por las bases nitrogenadas. Como consecuencia de esta característica, el plomo se utiliza mucho en la fabricación y el manejo del ácido sulfúrico y ácido nítrico (Martin, 2008).

Durante mucho tiempo se ha empleado el plomo como pantalla protectora para las máquinas de rayos X; en virtud de las aplicaciones cada vez más amplias de la energía atómica, se han vuelto cada vez más importantes las aplicaciones del plomo como blindaje contra la radiación y los malos olores producidos por ésta. Su utilización como cubierta para cables, ya sea la de teléfono, de televisión, de internet o de electricidad, sigue siendo una forma de empleo adecuada. La ductilidad única del plomo lo hace particularmente apropiado para esta aplicación, porque puede estirarse para formar un forro continuo alrededor de los conductores internos.

Se utilizan una gran variedad de compuestos de plomo, como los silicatos, los carbonatos y sales de ácidos orgánicos, como estabilizadores contra el calor y la luz para los plásticos de cloruro de polivinilo. Se usan silicatos de plomo para la fabricación de frituras de vidrio y de cerámica, las que resultan útiles para introducir plomo en los acabados del vidrio y de la cerámica. El azuro de plomo, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, es el detonador estándar para los explosivos. Los arsenatos de plomo se emplean en grandes cantidades como insecticidas para la protección de los cultivos y para ahuyentar insectos molestos como lo son cucarachas, mosquitos y otros animales que posean un exoesqueleto. El litargirio (óxido de plomo) se emplea para mejorar las propiedades magnéticas de los imanes de cerámica de ferrita de bario (Martin, 2008).

II.1.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS METALES PESADOS

Existen sólo tres mecanismos a través de los cuales un sistema puede conferir resistencia a metales pesados:

- (i) disminución de la acumulación de un determinado ión mediante su transporte activo fuera de la célula;
- (ii) segregación de los cationes por moléculas que contienen grupos tioles;
- (iii) reducción de algunos iones metálicos pesados a un estado de oxidación menos tóxico.

Sin embargo, i) y (iii) no pueden funcionar como mecanismos de detoxificación únicos en una célula. Por consiguiente, el “metabolismo” de los metales pesados es llevado cabo fundamentalmente por un “metabolismo” de transporte o en última instancia por una combinación de mecanismos (Marrero, 2010).

Algunos metales como cobalto, cobre, níquel y zinc, a concentraciones traza (10^{-1} Mmol), son esenciales para algunos procesos celulares, ya que ejercen funciones catalíticas en determinadas reacciones bioquímicas o en conversiones metabólicas, actúan como micronutrientes, cofactores enzimáticos, o pueden estabilizar estructuras proteicas (Bruins,2000). Sin embargo a concentraciones superiores ejercen un marcado efecto citotóxico, por lo cual el mantenimiento de las concentraciones adecuadas de ellos constituye un factor importante para lograr la homeostasis celular. Existen dos sistemas de captura de metales pesados, uno es rápido, inespecífico, constitutivo, dependiente del sistema quimiosmótico y utilizado por variedad de sustratos y el otro es lento específico, utiliza ATPasas en adición al gradiente quimio-osmótico, y es inducible en condiciones desfavorables. Así por ejemplo, si una célula bacteriana se encuentra en un ambiente con elevada concentración de un catión pesado es transportado al citoplasma, por el sistema constitutivo rápido pero inespecífico, donde interactúa con los grupos funcionales de las proteínas de transporte, enzimas, desplaza metales esenciales desde de sus sitios de reacción y esa es la causa de la citotoxicidad. Si el gen que codifica para este sistema muta, se obtienen mutantes que son tolerantes a metales (Marrero, 2010).

La acumulación de metales pesados en los ecosistemas, sumado a este sistema de captación de metales ha conducido durante la evolución de la vida al desarrollo de la homeostasis de los metales pesados. Esto se debe a un proceso de adaptación natural al medio por desarrollo o adquisición de genes que contrarresten la acción de los metales pesados. Entonces resultan los microorganismos resistentes quienes se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, constitutivos o inducidos por la presencia del metal mientras que los microorganismos tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia del elemento (Trajanovska, 1997).

La mayoría de los sistemas de resistencia se basan en el eflujo activo de iones tóxicos como Cobalto, Cadmio mediante proteínas facilitadoras de la difusión de cationes (*Cation Diffusion Facilitator*), ATPasas de tipo P y los transportadores compuestos por proteínas del grupo de resistencia, nodulación y división celular (RND) (Nies, 2003). Los genes que codifican la resistencia pueden hallarse en el cromosoma, en plásmidos o en transposones, en la tabla 1, podemos ver aquellos genes de resistencia ubicados en el cromosoma de algunas bacterias. Los genes de resistencia presentes en plásmidos confieren resistencia a altas concentraciones de metales, son inducibles y muy específicos (Marrero-Coto, 2010).

Tabla 1. Determinantes genéticos de resistencia a metales pesados ubicados en cromosoma

| Determinante genético | Metal al que confiere resistencia | Localización | Cepa bacteriana | Mecanismo involucrado |
|-----------------------|-----------------------------------|--------------|---|--|
| znt. | Zn(II), Co(II). | Cromosoma. | <i>S. aureus</i> . ¹⁴⁸ | Expulsión mediante transportador tipo CDF (RzcB). |
| | Zn(II), Cd(II). | Cromosoma. | <i>C. metalidurans</i> CH34. ⁴⁹ | Expulsión mediante ATPasa tipo P (ZntA). |
| | Zn(II), Cd(II), Pb(II). | Cromosoma. | <i>E. coli</i> . ²² | Expulsión mediante transportador tipo CDF (ZitB). Expulsión mediante ATPasa tipo P (ZntA). |
| cus. | Cu(II). | Cromosoma. | <i>C. metalidurans</i> CH34. ^{49,140} | Expulsión mediante transportadores del tipo RND asociados a proteínas MFP y OMF(CusCBA). |
| | Cu(II), Ag(I). | Cromosoma. | <i>E. coli</i> . ¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ | Unión del metal a proteínas (CusF). |
| cup. | Cu(II). | Cromosoma. | <i>C. metalidurans</i> CH34. ^{49,139} | Eflujo mediante ATPasa tipo P (CupA). |
| nir. | Ni(II). | Cromosoma. | <i>K. oxytoca</i> CCUG 15788. ^{97,116} (NCBI: AY492000). | Eflujo del catión mediante las proteínas NirA (del tipo MFS) y NirC (del tipo RND). |
| ncr-nre. | Ni(II), Co(II). | Cromosoma. | <i>H. alvei</i> 5-5. ⁹⁸ <i>S. marcescens</i> C-1. ^{40,99} <i>L. ferriphilum</i> UBK03. ¹⁰⁰ | Eflujo del catión mediante una proteína de la familia MFS (NreB). Captura del metal (NcrC). |

Fuente: Marrero-Coto, 2010

II.2 BIORREMEDIACIÓN

Según la Environmental Protection Agency (EPA), biorremediación se define como los procesos en los que se usan microorganismos o enzimas producidas por éstos para transformar o degradar contaminantes tóxicos en los ecosistemas (Sylvia *et al*, 2005). Las interacciones metal-microbiota son estudiadas en profundidad en el contexto de la biotecnología ambiental, con el objeto de implementar métodos de remoción, recuperación o detoxificación de metales pesados y radionúclidos (Lovley,2000). El estudio de las interacciones de los microorganismos con sus mecanismos de tolerancia, expone el potencial de éstos para ser utilizados en procesos biotecnológicos como la biorremediación de la contaminación ambiental por metales pesados (Soto *et al*,2010).

Existen en la práctica tres categorías generales de procesos biotecnológicos para el tratamiento de residuos líquidos que contienen metales tóxicos: la biosorción (bioacumulación y bioadsorción), la precipitación extracelular y la captación a través de biopolímeros purificados y de otras moléculas especializadas, derivadas de células microbianas. Estos procesos no son excluyentes y pueden involucrar fenómenos fisicoquímicos y biológicos (Cañizares, 2000).

Existen múltiples reportes de estudios de investigación a nivel mundial donde se menciona que los métodos para el tratamiento de aguas residuales con metales incluyen: precipitación, oxidación, reducción, intercambio iónico, filtración, tratamiento electroquímico, tecnologías de membrana y recuperación por evaporación, resultan costosos e ineficientes, especialmente cuando la concentración de los metales es muy baja (Volesky,1990). Los métodos químicos para la eliminación de metales pesados también resultan costosos debido a que el agente activo no puede ser recuperado para su posterior reutilización. Además, el producto final es un lodo con alta concentración de metales lo que dificulta su eliminación y por ello se propone a los microorganismos y sus productos como bioacumuladores eficientes de metales solubles y particulados, especialmente a partir de concentraciones externas diluidas (Cañizares,2000).

La biotecnología ha separado dos grandes áreas dentro del mismo objetivo: bioacumulación y biosorción, la primera es considerada como un proceso activo de eliminación de metales pesados mediante mecanismos metabólicos involucrando biomasa viva, mientras que biosorción es entendido como un proceso pasivo con mecanismos netamente físicoquímicos, por medio de biomasa muerta. Por tanto, la biosorción es un área de investigación con muchos aportes a la comunidad industrial, por ser una alternativa técnica y económicamente viable, tanto por su capacidad de depuración como por el moderado costo de operación que tiene, y por ser considerada una tecnología “limpia” en la eliminación de metales pesados de aguas residuales o de desecho de actividades productivas (Martin, 2008). Las variables pH, concentración de iones, presencia de electrolitos, concentración y tratamiento de biomasa son significativas en la biosorción de iones Pb^{2+} , Cd^{2+} y Cr^{3+} en solución cuando se usa biomasa muerta de *Saccharomyces cerevisiae* (Rodríguez *et al*, 2008).

II.2.1 BIOSORCIÓN DE METALES POR MEDIO DE MICROORGANISMOS

II.2.1.1 SORCIÓN O ADSORCIÓN

El término sorción deviene de la capacidad que tienen las sustancias húmicas y arcillas del suelo para unir aniones y cationes, este proceso es denominado adsorción o sorción. En la adsorción una especie química puede ser adsorbida electrostáticamente, mientras que en la sorción una especie química puede ser acumulada en la superficie mediante interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y /o de precipitación. La sorción también se puede definir como la transferencia de iones de una fase en solución a una fase sólida (Mejía, 2006).

El concepto biosorción de metales pesados, se refiere a la captación de iones metálicos por medio de una biomasa viva o muerta (la diferencia es el poder tóxico de los metales, que puede afectar cuando se trabaja con biomasa viva), a través de mecanismos físicos y químicos, como la adsorción y el intercambio iónico. Cuando se utiliza biomasa viva, los diferentes procesos metabólicos indispensables para el desarrollo de cualquier organismo vivo pueden contribuir en el proceso. El proceso

básico de biosorción es igual al proceso de sorción y utiliza los mismos modelos matemáticos para cuantificar la remoción de un metal, en particular de una solución contaminada con éste (modelos de Freundlich y Langmuir).

Los primeros estudios de investigación acerca de biosorción de metales pesados se realizaron en la universidad de Mc Gill en Montreal, donde emplearon biomasa de hongos como *Rhizopus* o de bacterias como *Bacillus subtilis*; y además algas como *Sargassum* y *Ecklonia* (Volesky y Holand, 1995).

Los microorganismos que actúan como biosorbentes son puestos en contacto con el medio acuoso contaminado y una vez que esta biomasa ha removido los iones metálicos del medio acuoso, se tiene la opción de recuperar la biomasa viva e introducirla en un nuevo ciclo de biorrecuperación o biorremediación (se utilizan químicos suaves para bajar el pH y retirar los metales, sin destruir las células bacterianas). En caso de que no importe la integridad funcional de la biomasa o se trabaje con biomasa muerta, el o los metales se pueden retirar por métodos más drásticos como la incineración (Mejía, 2006). Desde finales de los 60's se han venido investigando organismos (plantas, microorganismos, hongos y algas) que son potencialmente eficientes en la biorremediación de metales pesados. Así, mostraron la producción de enzimas bacterianas para la oxidación del hierro (Andersen y Lundgren, 1969), determinaron la concentración y acumulación de iones metálicos en la bacteria *Zoogloea* (Friedman y Dugan, 1968), estudiaron el mecanismo de oxidación del Fe por la bacteria *Ferrobacillus ferrooxidans* (Din y Suzuki, 1967).

En los 80's se profundizó sobre el mecanismo de acción de las bacterias para transformar y/o biosorber iones metálicos; se empezó a investigar más organismos con potencial biorremediador de este modo se encontró la selectividad de *Bacillus subtilis* por algunos iones metálicos (Doyle *et al*, 1980), y se investigó la reducción del hierro y el manganeso por bacterias fotosintéticas (D'Souza en 1983 (citado por Volesky, 1995). A partir de 1986 se estudiaron bacterias, como *Pseudomonas*, diferentes tipos de algas y de hongos como *Penicillium*, *Rhizopus* y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*. Además se empezó a investigar sobre los péptidos involucrados en la retención de iones metálicos, diseñando muchas secuencias de

aminoácidos (principalmente secuencias ricas en cisteína, glicina e histidina) para tal fin, y luego expresando los genes que codifican para esos péptidos en bacterias, aumentando así su potencial de biosorción (Mejía, 2006).

En el Perú; a nivel laboratorio se ha logrado remover 94,8 % de sulfatos; 99,60 % de hierro, 99,23 % de plomo y 98,57 % de cobre empleando BSR (Bacterias Sulfato Reductoras) y mecanismos de biosorción con especies fitorremediadoras (Palomino, 2004). Por otro lado también se ha aportado valiosa información y patentado una nueva tecnología denominada NCD (Neutralización y Coagulación Dinámica) para el tratamiento del DAM basado en procesos fisicoquímicos desarrollados en Canadá, tecnología HDS (Lodos de Alta Densidad), actualmente esta tecnología viene siendo aplicada para descontaminar los ríos Yauli y Mantaro en la principal fuente de contaminación ácida que es el efluente del Túnel Kingsmill “que descarga de 1100 a 1800 L/s de agua ácida, en lo que probablemente constituye en mayor caudal de agua ácida del mundo” (Villachica *et. al* 2005) .

También se ha reportado la flora heterotrófica acompañante de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en muestras de agua de mina, relaves y mineral de la Mina de la Sociedad Minera Condestable en Mala-Lima , encontrando cepas resistentes a Fe y tolerantes a pH ácido (Gutiérrez ,1998), el comportamiento de los microorganismos heterótrofos en los ambientes de faena minera (Maturrano,1996), estudió la resistencia a diferentes concentraciones de metales pesados encontrando patrones de resistencia variados (Gutiérrez *et al* , 2011), se ha demostrado que los métodos químico y biogénico para el tratamiento del drenaje ácido de la mina Cerro de Pasco lograron reducir hasta en 99,99 % la concentración de metales pesados, pero el biogénico no dejó lodos contaminantes (Nina, 2008) . Finalmente se probó la capacidad de biosorción de cadmio y plomo de la biomasa muerta por calor (121°C durante 15 minutos) de la cepa M8A-2T, la cual se identificó mediante el sistema de identificación API 20E como *Serratia marcescens* . La biomasa muerta, de la cepa que es motivo del presente estudio, logró remover 91,57 % de cadmio y 74,04 % de plomo a pH 9 después de 60 minutos de enfrentamiento (Ballardo , 2013).

II.2.1.2 MODELOS DE SORCIÓN EN EQUILIBRIO

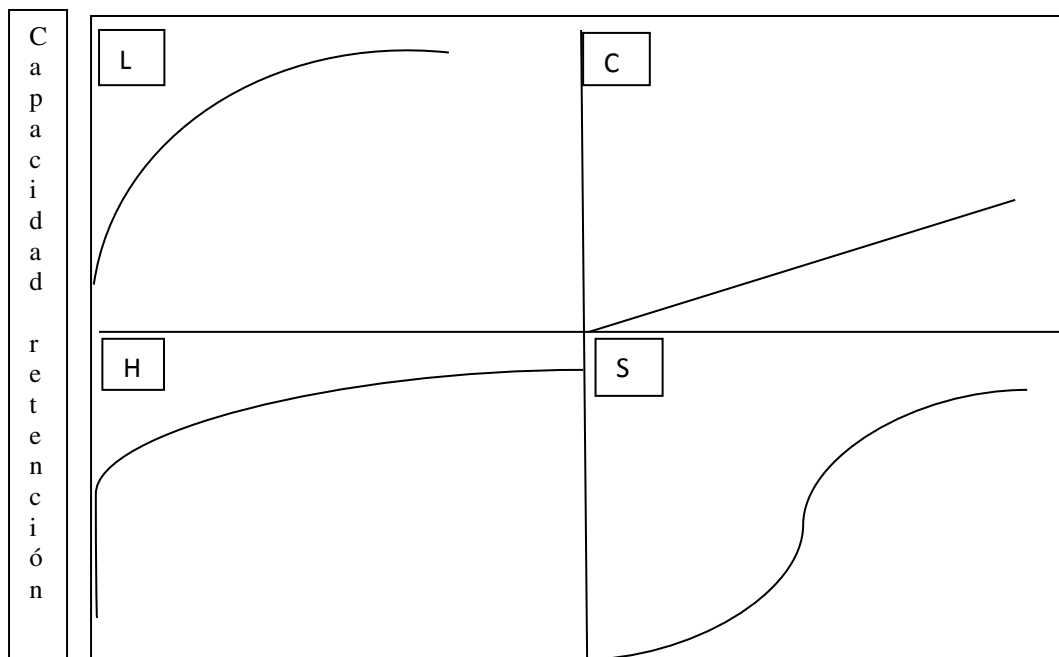
Estos modelos consideran al suelo como material homogéneo y por tanto las reacciones de sorción son reversibles y se basan en la reacción general



Las isothermas de sorción describen la relación entre la concentración disuelta de la especie química a sorber y la cantidad sorbida por el sorbente, las unidades son de especie sorbida por unidad de masa de biosorbente.

Aproximación de Langmuir, éste modelo incorpora algunas asunciones :

- ❖ El número de superficies de sorción es aproximada (no se sabe)
- ❖ La sorción incluye una monocapa
- ❖ La sorción es independiente de la cobertura superficial
- ❖ Todos los sitios de sorción estan representados por grupos funcionales similares.
- ❖ Las isothermas son de tipo L,S,C y H



Fuente : Mejía,2006

Concentración en equilibrio

Figura 1. Tipos de isoterma de Langmuir

Tabla 2. Capacidad máxima de sorción de algunas cepas bacterianas

| Ión metálico | Especies bacterianas | Capacidad de biosorción | Referencias |
|--------------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| Pb | <i>Pseudomonas putida</i> | 56.2 | Pardo et al. (2003) |
| Pb | <i>Streptomyces rimosus</i> | 135.0 | Selatnia et al. (2004c) |
| Pb. | <i>Bacillus sp</i> | 92.3 | Tunali et al. (2006) |
| Pb | <i>Bacillus firmus</i> | 467 | Salehizadeh & Shojaosadati (2004) |
| Pb | <i>Corynebacterium glutamicum</i> | 567.7 | Choi & Yun (2004) |
| Pb | <i>Enterobacter sp.</i> | 50.9 | Lu et al. (2006) |
| Pb | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 79.5 | Chang et al. (1997) |
| Pb | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 0.5 | Lin y Lai (2006) |
| Pb | <i>Pseudomonas putida</i> | 270.4 | Uslu y Tanyol (2006) |
| Cd | <i>Aeromonas caviae</i> | 155.3 | Loukidou et al. (2004) |
| Cd | <i>Enterobacter sp.</i> | 46.2 | Lu et al. (2006) |
| Cd | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 42.4 | Chang et al. (1997) |
| Cd | <i>Pseudomonas putida</i> | 8.0 | Pardo et al. (2003) |
| Cd | <i>Pseudomonas sp.</i> | 278.0 | Ziagova et al. (2007) |
| Cd | <i>Staphylococcus xylosus</i> | 250.0 | Ziagova et al. (2007) |
| Cd | <i>Streptomyces pimprina</i> | 30.4 | Puranik et al. (1995) |
| Cd | <i>Streptomyces rimosus</i> | 64.9 | Selatnia et al. (2004a) |

Fuente: Adaptado de Wang, 2009

II.3 *Serratia marcescens*

Las primeras referencias, aunque indirectas, de individuos del género *Serratia* datan de tan antiguo como del año 332 A.C. cuando las tropas macedonias de Alejandro Magno en la ciudad de Tiro, se enfervorizaron ante la observación de un hecho “milagroso”: del interior de las porciones del pan destinado al alimento de la tropa, aparecían gotas de sangre fresca. Este fenómeno fue interpretado como profecía del triunfo y empujó al previamente desanimado ejército a la victoria. Referencias similares a la narrada anteriormente, se encuentran fácilmente en la literatura hasta mediados del siglo XIX (Alonso, 1991).

En 1850 Ehrenberg recopila casi 100 referencias históricas que hacen mención a apariciones milagrosas de sangre en alimentos (Gaughran,1965). En 1823 Bartolomeo Bizio, un joven farmacéutico, demuestra que la “sangre” era producida por un organismo vivo clasificado de manera errónea como un hongo. Bizio denomina a este organismo *Serratia marcescens* en honor al físico italiano Serafino Serrati, quien en la opinión de Bizio había sido menospreciado a favor de sus colegas americanos por la invención y desarrollo de la máquina de vapor aplicada al transporte por agua. *Marcescens* deriva de la palabra latina *marceo* que significa “decaer” dado que Bizio observaba que el pigmento y su consistencia evolucionaban rápidamente pasando de una forma rosa fluida a otra rojo púrpura de apariencia viscosa. Desde este momento se han sucedido distintos nombres para designar a este microorganismo entre los que se encuentran *Mucor sanguineus*, *Monas prodigiosa*, *Micrococcus prodigiosus*, *Bacillus prodigiosus*, *Salmonella marcescens*, *Salmonella prodigiosa*, *Chromobacterium prodigiosum* etc.

En la primera edición del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey publicada en 1923 se volvió a la denominación original de *Serratia marcescens*. La división del género *Serratia* en sus distintas especies, no ha sido menos conflictiva y se ha visto sujeta a continuos cambios a lo largo del tiempo así como a variaciones importantes entre distintos autores. En la cuarta edición del Manual de Bergey se citaban 27 especies dentro del género, 5 especies en la quinta edición y sólo una en la octava edición (Von Graevenitz,1980).

La taxonomía aceptada actualmente coincide con la aparecida recientemente en la novena edición del Manual de Bergey (Krieg,1984) que considera al género con número de orden VII dentro de la Familia de las *Enterobacteriaceae*, tribu *Klebsiellae*, y lo divide en las siguientes especies: *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. plymuthica*, *S. rubidea*, *S. odorifera* y *S. ficaria*. En dicho manual se indica la subdivisión de *S. liquefaciens* en tres genopecies: *S. liquefaciens* propiamente dicha, *S. proteamaculans* y *S. grimesii*. La antigua especie *S. fonticola* aparece catalogada dentro del apartado *Incertae Sedis*. Posteriormente a la publicación del Manual Bergey's, ha sido aceptado una nueva especie del género: *S. entomophila*

(Grimont,1989) que se caracteriza fundamentalmente por su incapacidad de fermentar el sorbitol.

Los miembros del género *Serratia* son bacilos gram negativos cortos y rectos de 0,5 - 0,8 μm de diámetro y 0,9 - 2,0 μm de longitud, generalmente móviles, por flagelos peritricos. Son anearobios facultativos, oxidasa negativos, fermentan la glucosa y reducen el nitrato. Son en general indol negativo, Voges-Proskauer positivo y Citrato de Simmons positivo. Son productores de un gran número de enzimas que resultan muy útiles en su identificación tales como catalasa, desoxirribonucleasa extracelular, gelatinasa, lipasa, lecitinasa, quitinasa, esterasa (hidrólisis de Tween 80), una proteasa que hidroliza caseína y fibrinolisisina y fosfatasa (Von Graevenitz,1980).

Como el resto de *Enterobacteriaceae*, *Serratia spp.* crece bien en medios de cultivo ordinarios, bajo condiciones aerobias o anaerobias. Casi todas las cepas son capaces de crecer en un rango de temperaturas entre 10 y 37°C, a pH entre 5 y 9 y con un contenido de NaCl de 0 - 4%. Las colonias son generalmente opacas, algo iridiscentes y pueden ser de color blanco, rosa o incluso rojo intenso y tienen un tamaño aproximado de 1,5 a 2 mm después de una incubación de 18 horas sobre un medio de cultivo nutritivo sólido. Los cultivos pueden producir un olor similar al de la orina o pescado en descomposición atribuido a la producción de trimetilamina y amoníaco (*S.marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. plyimuthica* y *S. rubidea*) o a humedad similar al de la patata cruda debido a la aparición de 2-metoxi-3-isopropil-pirazina (*S. odorifera*, *S. ficaria* y *S. rubidea*) (Krieg,1984). A pesar de que este microorganismo no requiere medios especiales para crecer, se han propuesto algunos medios selectivos para su identificación y el cálculo de la incidencia de *Serratia* en diversos tipos de muestras contaminadas tales como heces (Krieg,1984).

Las diversas especies del género *Serratia* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, pueden encontrarse en las aguas dulces, en las hojas vegetales, frutos, hongos hierbas y musgos. Las plantas pueden constituir el vehículo de entrada al entorno ecológico del hombre. Además muchos insectos

están colonizados por miembros del género; algunos de ellos pueden ser patógenos para las numerosas especies de los que se han aislado. Un número considerable de representantes se han establecido en los hospitales, en donde son una causa importante de infección nosocomial (Grimont,1978).

Aunque existen algunos ejemplos en la literatura de aislamientos en muestras clínicas de otras especies de *Serratia* (Ewing,1972; Johnson,1974; Croize,1988), la especie más difundida y la de mayor relevancia clínica es sin duda alguna *S. marcescens*. La característica fundamental de diferenciación de *S. marcescens* con otros miembros del género es su incapacidad de fermentar la L-arabinosa. Un porcentaje de cepas producen el típico pigmento rojo prodigiosina. Este porcentaje es mayor en las cepas aisladas de medios naturales que en las cepas aisladas en relación con la clínica.

La estructura antigénica de *S. marcescens* es compleja, tres tipos de antígenos pueden diferenciarse: antígenos somáticos u “O”, antígenos flagelares o “H” y antígenos de la envuelta celular y cápsula o “K”. Desde los 6 primeros antígenos O descritos por Davis y Woodward en 1957 hasta la actualidad, nuevos antígenos somáticos han sido descubiertos hasta llegar al número actual de 24 (01, 02,..., 024) (Gaston,1989). Dichos antígenos son complejos de naturaleza polisacárida, estables al calor, resistentes a alcoholes, solubles en ácidos y pueden tener cierta utilidad en tipación serológica a pesar del gran número de reacciones cruzadas de aglutinación que ofrecen sus antisueros. Los antígenos flagelares dependen de la variedad y ordenación de los aminoácidos que forman la flagelina del filamento. Hasta la actualidad se han descrito 26 antígenos H (H1, H2,..., H26) (Gaston,1989). Los antígenos K no han sido estudiados en profundidad en *S. marcescens* hasta el momento. Su naturaleza química es glicoprotéica. Se denomina A al antígeno capsular y L y B a los antígenos de superficie de la envuelta celular. L y B son fácilmente distinguibles por sus diferencias en cuanto a estabilidad al calor (Von Graevenitz,1980).

Hasta la década de los 50, *S. marcescens* era considerado un microorganismo saprofita, y ha sido por ello utilizada en numerosas ocasiones como marcador

biológico. Cabe destacar el experimento realizado por M.H. Gordon por el cual tras realizar gargarismos con un cultivo líquido de *S. marcescens* recitó pasajes de Shakespeare en la Cámara de los Comunes en la que se habían distribuido placas de agar, para estudiar la posible transmisión oral de microorganismos tras una epidemia de gripe sufrida por los miembros de la cámara; o la aerosolización de cultivos por la aviación americana en 1950 y 1952 sobre San Francisco, Alabama y Florida, con objeto de estudiar la vulnerabilidad de la población americana ante la guerra bacteriológica (Yi, citado por Alonso,1991).

Actualmente se sabe que este microorganismo puede estar implicado como agente etiológico en todo tipo de infecciones incluyendo aquellas del tracto respiratorio (absceso pulmonar, bronquiectasis, neumonía y empiema) y del tracto urinario, infecciones del sistema músculo-esquelético (artritis séptica y osteomielitis), infecciones oculares, linfadenitis e infecciones de la piel (Alonso,1991).

III. HIPÓTESIS

Los microorganismos aislados en ambientes mineros presentan características físicas, químicas y genéticas asociadas a la resistencia a metales pesados, que deben ser conocidas y optimizadas para poder ser empleados en los procesos de biorremediación.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo General

Diseñar un proceso biotecnológico de biorremoción de cadmio y plomo con una cepa nativa resistente a cadmio y plomo, aislada de un ambiente minero, a nivel de laboratorio.

IV.2 Objetivos específicos:

- ✓ Seleccionar una cepa nativa aislada en un ambiente minero, con altos niveles de resistencia a cadmio y plomo
- ✓ Evaluar la producción de biomasa de una cepa resistente a cadmio y plomo
- ✓ Establecer las condiciones físico-químicas óptimas para la biorremoción de Cd y Pb
- ✓ Estudiar el efecto del tamaño y la concentración de la partícula biosorbente en la capacidad de remoción de cadmio y plomo
- ✓ Establecer la naturaleza molecular de la capacidad biosorbente de cadmio y plomo
- ✓ Alcanzar el equilibrio del proceso biosorbente empleando las Isotermas de Langmuir

- ✓ Optimizar las condiciones de biorremediación para plantear su escalamiento

V. MATERIAL

V.1 Material biológico

157 cepas aisladas en la mina de la Sociedad Minera Condestable. Mala. Lima
Cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Cepa control sensible a antibióticos y metales pesados) gentilmente donada por la empresa IQ Farma.

Cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Cepa control positivo de presencia de plásmido)

VI. MÉTODOS

VI.1 REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS

Las cepas, aisladas de agua de mina, relave y mineral de la mina de la Sociedad Minera Condestable en los años 1992-1993 (Gutiérrez, 1998), fueron mantenidas mediante subcultivos seriados anuales en viales conteniendo Agar Tripticasa Soya (TSA) y guardadas a temperatura ambiente. Las cepas fueron reactivadas en 2,5 ml de caldo Tripticasa Soya (TSB), incubadas a temperatura ambiente durante 24 a 36 horas y luego sembradas por estriado sobre placas de Agar Tripticasa Soya (TSA) bajo las mismas condiciones; para comprobar la viabilidad de las cepas. Asimismo, se comprobó la pureza microscópicamente mediante tinción Gram.

VI.2 PREPARACIÓN DEL INÓCULO PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD A METALES PESADOS

El inóculo se preparó de acuerdo a Velandia (2008) a partir de la emulsión de una colonia de las cepas en estudio en 10 ml de solución salina estéril al 0,9 % (P/V), utilizando vórtex para homogenizar y obtener una suspensión con una turbidez igual al patrón 0,5 de la escala de Mc Farland. Para facilitar la comparación del tubo patrón de Mc Farland y la suspensión del microorganismo, se trazó una línea negra gruesa sobre una hoja de papel y sobre ésta se colocaron simultáneamente los dos tubos, para observar la línea con la misma nitidez en los dos tubos.

VI.3 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A METALES PESADOS

Para determinar la resistencia a metales pesados se empleó el método de cilindro en placa de acuerdo a Grove y Randall (1955). Se prepararon los inóculos de las cepas en estudio del modo descrito en el ítem anterior y se estriaron en tres planos, con hisopo, sobre placas conteniendo 15 ml de agar Müller-Hinton. Se dejó reposar entre 10 - 15 minutos y luego con la parte posterior de una pipeta Pasteur se hicieron pocillos de 7 mm de diámetro y 5 mm de altura, donde se colocó la solución de los metales a probar. La sal de metal pesado que se utilizó se disolvió en agua deionizada y se esterilizó por filtración sobre membrana de acetato de celulosa de 0,45 μm de porosidad.

Se emplearon las sales de $\text{Cl}_2\text{Ni} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ para preparar concentraciones entre 4 000 y 16 000 ppm (mg/L) de níquel, $\text{K}_2\text{CrO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ para preparar concentraciones entre 12 000 y 36 000 ppm de cromo, $\text{Cd}(\text{SO}_4)_2$ para preparar concentraciones entre 200 y 800 ppm de cadmio, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ para preparar concentraciones entre 8 000 y 32 000 ppm de plomo y $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para preparar concentraciones entre 20 000 y 80 000 ppm de zinc. Luego se incubaron las placas a 28 - 30° C por 24 horas. El control positivo utilizado fue nitrato de mercurio a concentración de 500 ppm. Se consideró como halos de inhibición de crecimiento los halos que estaban en el rango de 0 a 10 mm de diámetro. El control negativo fue el agua deionizada estéril. Se procedió a realizar las lecturas de los halos de inhibición dando valores en mm de diámetro, dado que no existe una tabla que nos de sensibilidad o resistencia a los metales pesados en base a halos de inhibición de crecimiento los resultados se compararon con los halos obtenidos con la cepa control *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 dándonos el criterio de inclusión como resistentes a todas las que tengan halo con menor diámetro que el obtenido por la cepa control o en su defecto que su halo sea 0 mm.

VI.4 NATURALEZA FÍSICA DE LA RESISTENCIA A METALES PESADOS

Las cepas seleccionadas por presentar la mayor resistencia a metales pesados fueron sembradas en medio SOC (Tryptona 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl

0,6 g/l, KCl 0,2 g/l, MgCl₂ 0,95 g/l y glucosa 3,6 g/l) por 18 horas a 37°C para luego extraer los posibles plásmidos usando el *kit* de *Pure Link® Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen), para lo cual se siguieron las instrucciones detallados por el *kit*, en caso de bacterias Gram positivas se suplementó con lisozima (5 ug/ml).

Para la visualización de los posibles plásmidos extraídos se realizó una electroforesis en agarosa al 2%, cada pocillo se cargó con 10 µl de la muestra y 3 µl del buffer de carga, usando como marcador de peso molecular un DNA GenRuler 1Kb *ladder* (Thermo Scientific) y además se utilizó la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como control positivo de presencia de plásmido. Se inició la corrida electroforética a 120 voltios por 2 horas. Para el revelado se usó una solución de bromuro de etidio (10mg/ml), y se visualizó el ADN plasmídico con la ayuda de un transiluminador.

VI.5 CINÉTICA DE CRECIMIENTO

La cinética de crecimiento se llevó a cabo empleando un sistema de cultivo por lotes en caldo nutritivo, con las cepas que presentaron los mayores niveles de resistencia a más de un metal pesado. Para este fin se procedió a hacer un escalamiento desde 3 mL hasta 30 L agitando el cultivo durante 12 a 14 horas a 125 rpm y 28° C. Cada 2 horas se extrajeron alícuotas de 20 mL para seguir la evolución de la turbidez a 540 nm en un espectrofotómetro y evaluar la concentración de biomasa por peso seco (mg/ml) en cada punto así como los parámetros cinéticos de cada cepa.

VI.6 OBTENCIÓN DE BIOMASA

La biomasa se obtuvo por centrifugación del cultivo en fase estacionaria, a 5 000 rpm durante 30 minutos en una centrifuga Wifug X1. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó 2 veces con agua destilada para quitar iones u otros residuos del medio a 5 000 rpm por 30 min según Leung y Chua. (2001).

VI.7 SECADO DE BIOMASA

El precipitado final, se depositó en un crisol previamente pesado en balanza analítica y se puso a secar a 80°C durante 3 a 5 horas hasta obtener un peso constante.

Una vez seca, la biomasa fue desprendida de los crisoles con una espátula de punta fina y molida en un mortero de porcelana para después colocarla dentro de placas Petri que fueron selladas con *parafilm* y almacenadas dentro de una campana de vacío hasta su uso para las pruebas de biosorción.

VI.8 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE BIOMASA

Se prepararon 50 ml de soluciones monometálicas de $\text{Cd}(\text{SO}_4)_2$ y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ a concentración final de 100 ppm de Cd y Pb respectivamente a pH 3 y a las que se les agregó suficiente biomasa seca para alcanzar 0,01, 0,1 y 1 mg/ml como concentración final. Se mantuvieron en agitación a 120 rpm por 60 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron a 5 000 rpm durante 30 min. El sobrenadante se filtró sobre una membrana de acetato de celulosa con poro de 0.45 μm de diámetro. Luego los filtrados se colocaron en frascos de plástico a 4°C hasta su lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica, para medir la concentración de Cd y Pb residual. El experimento se realizó por duplicado.

VI.9 DETERMINACIÓN DE pH ÓPTIMO

Se prepararon 50 ml de soluciones mono metálicas de $\text{Cd}(\text{SO}_4)_2$ y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ que tenían una concentración final de 50 ppm de Cd y Pb con un pH final de 3, 5, 7, y 9 a temperatura ambiente. A estas soluciones se les agregó 50 mg de biomasa seca y se dejaron 1 hora en agitación constante a 120 rpm, a temperatura ambiente. Luego las soluciones se centrifugaron a 5 000 rpm durante 30 minutos para recuperar los sobrenadantes e inmediatamente se filtraron sobre una membrana de acetato de celulosa con un poro de 0,45 μm de diámetro de acuerdo con Yan & Viraraghavan

(2003) y se guardaron en frascos plásticos de primer uso para su posterior análisis en el espectrofotómetro de absorción atómica de la concentración de Cd y Pb residual. Los experimentos se realizaron por duplicado.

VI.10 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE ENFRENTAMIENTO

Las soluciones mono metálicas de $\text{Cd}(\text{SO}_4)_2$ y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ preparadas a concentración final de 50 ppm de Cd y Pb a pH 3, se enfrentaron con la biomasa seca a razón de 1 mg/ml, para determinar el tiempo de interacción donde se captaba mayor cantidad de metal pesado. Se evaluaron tiempos de enfrentamiento de 0, 15, 30, 90 y 120 min en agitación a 120 rpm y temperatura ambiente. Inmediatamente de cumplido el tiempo de enfrentamiento, las soluciones se centrifugaron a 5 000 ppm durante 30 min. El sobrenadante se filtró sobre una membrana de acetato de celulosa con un poro de 0,45 μm de diámetro. Luego se colocaron los filtrados en frascos de plástico a 4°C para su posterior lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica, para medir la concentración de Cd y Pb residual. El experimento se realizó por duplicado.

VI.11 EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES INICIALES DE CADMIO Y PLOMO SOBRE LA CAPACIDAD DE BIOSORCIÓN

Se prepararon, por separado, 50 ml de soluciones monometálicas de $\text{Cd}(\text{SO}_4)_2$ y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ a concentraciones finales de 100, 200 y 600 ppm de cadmio y 200, 300 y 400 ppm de plomo, a pH 3; a estas soluciones se les agregó 1 mg/ml de la biomasa seca. Se mantuvieron en agitación a 120 rpm por 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente las mezclas se colocaron en tubos de centrifuga de 50 ml y se centrifugaron a 5 000 ppm por 30 min. El sobrenadante se recuperó con una pipeta y se filtró sobre una membrana de acetato de celulosa con poro de 0,45 μm de diámetro. Luego los filtrados se colocaron en frascos de plástico a 4°C hasta su lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica, para medir la concentración de Cd y Pb residual. El experimento se realizó por duplicado.

VI.12 EFECTO DE LA GRANULOMETRÍA EN LA CAPACIDAD DE BIOSORCIÓN

Para determinar si el tamaño de partícula de la biomasa influye en la remoción de metales pesados, se tamizó la biomasa con mallas cuya porosidad era de 50, 75 y 125 μm .

50 mg de biomasa de cada granulometría fue añadida a frascos conteniendo 50 ml de soluciones monometálicas de $\text{Cd}(\text{SO}_4)_2$ y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ a concentraciones finales de 100 ppm de Cd y Pb respectivamente. Se mantuvieron en agitación a 120 rpm por 60 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron a 5 000 rpm por 30 min. El sobrenadante se recuperó con una pipeta y se filtró sobre una membrana de acetato de celulosa con poro de 0,45 μm de diámetro. Luego los filtrados se colocaron en frascos de plástico para su posterior lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica, donde se determinó la concentración de Cd y Pb residual. Los experimentos se realizaron por duplicado.

VI.13 DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE EQUILIBRIO

Para determinar la constante de equilibrio, se siguió la metodología empleada por Larenas *et al* (2008) se prepararon soluciones con 50 ml cadmio en concentraciones de 100, 200 y 300 ppm y con 50 ml de plomo en concentraciones de 200, 300 y 400 ppm de plomo. Se añadió la biomasa en concentración final de 1 mg/ml; se agitó a 120 rpm durante 15, 30, 45, 60, 120 y 180 minutos. En cada tiempo se evaluó la concentración de cadmio y plomo residual.

La tasa de biosorción se halló de la siguiente ecuación:

$$q = \frac{(C_i - C_e) * V}{X_0}$$

donde

| | |
|-------|--------------------------------------|
| C_i | Concentración inicial |
| C_e | Concentración final en el equilibrio |
| V | Volumen de solución en L |

Xo g de biomasa

Q tasa de biosorción

La Q_{max} o capacidad de retención máxima de la biomasa fue hallada a partir de la ecuación de la isoterma de Langmuir

$$\frac{1}{q} = \frac{1}{q_{max}} + \frac{1}{b \cdot q_{max} \cdot C_e}$$

Donde:

q_{max} = Tasa máxima de retención de metal (mg de metal/ g biosorbente)

b = Constante relacionada a la afinidad del biosorbente por los iones metálicos

Pudiendo evaluarse la isoterma desde el factor adimensional R_L así:

$$R_L = 1 / (1 + b \cdot C_i)$$

Donde

R_L = 0 Sistema Isotérmico irreversible

0 < R_L < 1 Sistema Isotérmico favorable, siendo R = 1 lineal

R_L > 1 Sistema isotérmico desfavorable, la sorción del metal no es significativa

VI.14 MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS

Para la cuantificación de la concentración de metales pesados de cada uno de los sobrenadantes obtenidos se empleó el método de espectroscopía de absorción atómica por flama, de acuerdo con Gómez (2004), usando un equipo de absorción atómica modelo Shimadzu AA - 6800 (sensibilidad de 2 ppm), de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

El porcentaje de remoción se halló por medio de la fórmula propuesta por Monge (2009)

$$\% R = (C_o - C_f) / C_o \times 100 \%$$

Donde:

C_o= Concentración inicial del soluto en mg/L.

C_f= Concentración final del soluto en mg/L.

% R= Porcentaje de remoción

VI.15 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La microscopía electrónica de la bacteria captando metales se tomó del *pellet* que quedaba luego de centrifugar la muestra para el análisis del plomo residual y fue realizada en la Universidad de Alicante, empleando la metodología de Dick *et al* (1995). Las células bacterianas fueron fijadas en buffer glutaraldehído 2,5 %, lavadas y deshidratadas. Luego fueron embebidas en resina Epon 812 y se obtuvieron cortes no coloreados de 40 nm de grosor que fueron observados con un microscopio electrónico de transmisión JEOL modelo JEM-2010. Con una cámara GATAN modelo Orius SC600. Empleando el programa GATAN *digital micrograph* 1.80.70 para GM S1.8.0

VI.16 IDENTIFICACION MOLECULAR DE LA CEPA ELEGIDA

Para la identificación molecular de la cepa M8A-2T se tuvo que reactivar en agar TSA y luego se sembraron de 1 a 2 colonias en Caldo Luria Bertani. Para la extracción de DNA se utilizó el *Kit de Extracción Promega (Wizard® Genomic DNA Purification Kit)*. El gen del RNA ribosomal 16S, se amplificó por PCR usando la siguiente proporción de reactivos:

| | <i>Concentración Inicial</i> | <i>Concentración Final</i> | <i>Vol. x reacción</i> |
|-------------------------|----------------------------------|----------------------------|------------------------|
| <i>Master Mix</i> | | | 20 µl |
| <i>H2O</i> | - | - | 12 µl |
| <i>Primer F → 27F</i> | 10 µM | 0,5 µM | 2 µl |
| <i>Primer R → 1492R</i> | 10 µM | 0,5 µM | 2 µl |
| <i>ADN</i> | - | - | 4 µl |
| <i>TOTAL</i> | | | 40 µl |

Se emplearon los Primer 27 F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3')¹ y el 1492 R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3')¹. El ciclo de amplificación fue el siguiente:

| | |
|-----------------------|-------------|
| 94° C por 3 minutos | |
| 94° C por 15 segundos | } 30 ciclos |
| 55° C por 30 segundos | |
| 72° C por 2 minutos | |
| 72° C por 7 minutos | |

Para el secuenciamiento se envió el DNA a la Compañía Macrogen INC.

V.17 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los ensayos de determinación de la biosorción se realizaron por duplicado, por lo cual los resultados fueron analizados por ANOVA de un factor y la aplicación de la prueba de Tukey, usando el software estadístico SPSS v20.0 con la finalidad de determinar si existe diferencias significativas entre los valores de los resultados obtenidos.

¹ Disponible desde: <http://www.lutzonilab.net/primers/page604.shtml>

VII.RESULTADOS

VII.1 REACTIVACIÓN DE CEPAS

De un total de 157 cepas se reactivaron 122 (78,98 %) y no reactivaron 33 (21,02 %). Se preparó un cepario de trabajo y dos ceparios de reserva. Este resultado nos indica una viabilidad de 78.98 % en las cepas mantenidas en el laboratorio por subcultivo seriado, a temperatura ambiente y repicadas anualmente.

VII.2 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A METALES PESADOS

De las 122 cepas analizadas se obtuvieron 2 cepas que eran resistentes hasta 80 000 ppm de zinc, 20 cepas a 16 000 ppm de níquel, 1 cepa a 36 000 ppm de cromo, 23 cepas a 800 ppm de cadmio y 80 cepas a 32 000 ppm de plomo según podemos apreciar en las figuras N° 2, 3, 4, 5, 6 ,7 y 8 pues mostraron halos de inhibición de crecimiento entre 0 y 10 mm de diámetro. Ninguna cepa fue resistente a 500 ppm de mercurio (empleado como control negativo) ya que los halos con menor diámetro tenían entre 21 a 30 mm. Sólo el 13,51% del total de cepas fueron sensibles a todos los metales.

La cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 presentó halos de inhibición de 15 mm para 16 000 ppm de Ni, 25 mm para 36 000 ppm de Cr, 11 mm para 800 ppm Cd, 12 mm para 32 000 de Pb y 17 mm para 80 000 ppm de Zn

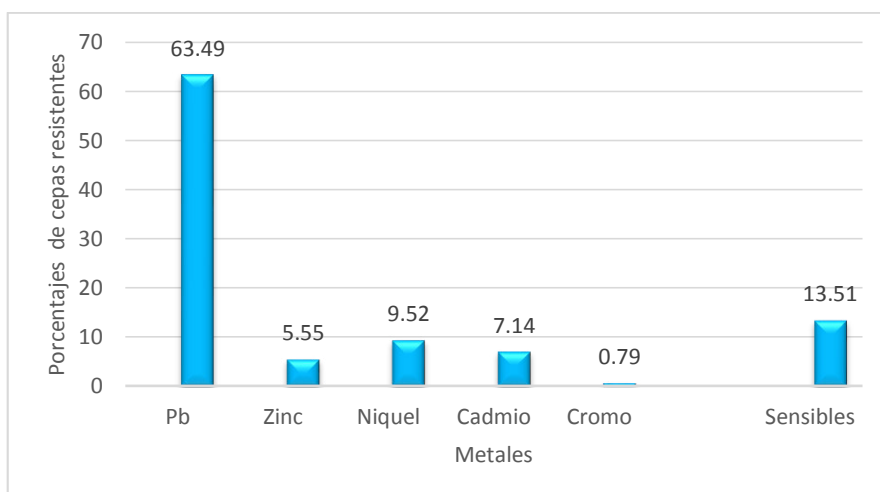


Figura 2. Porcentaje de cepas resistentes y sensibles a los diferentes metales pesados, en las máximas concentraciones probadas

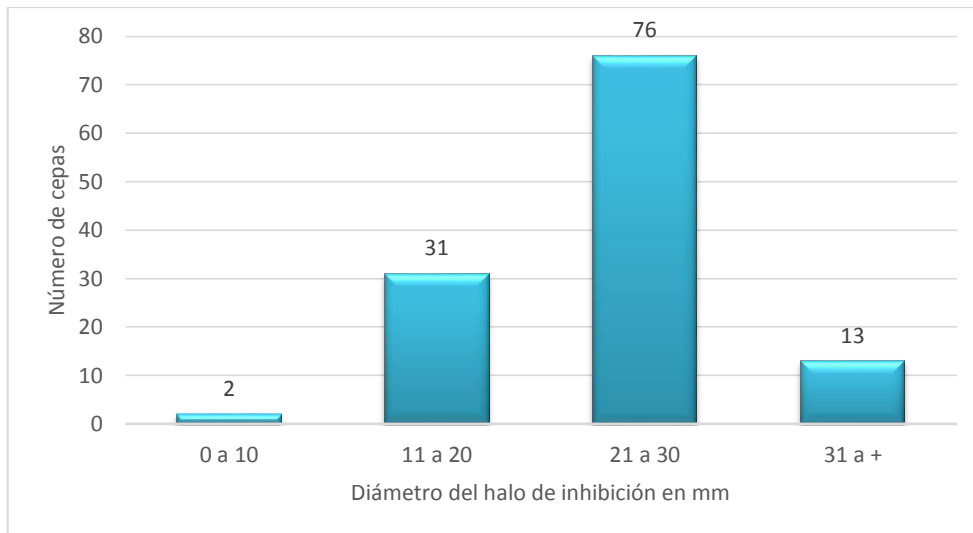


Figura 3. Comportamiento de las cepas frente a 80 000 ppm de zinc

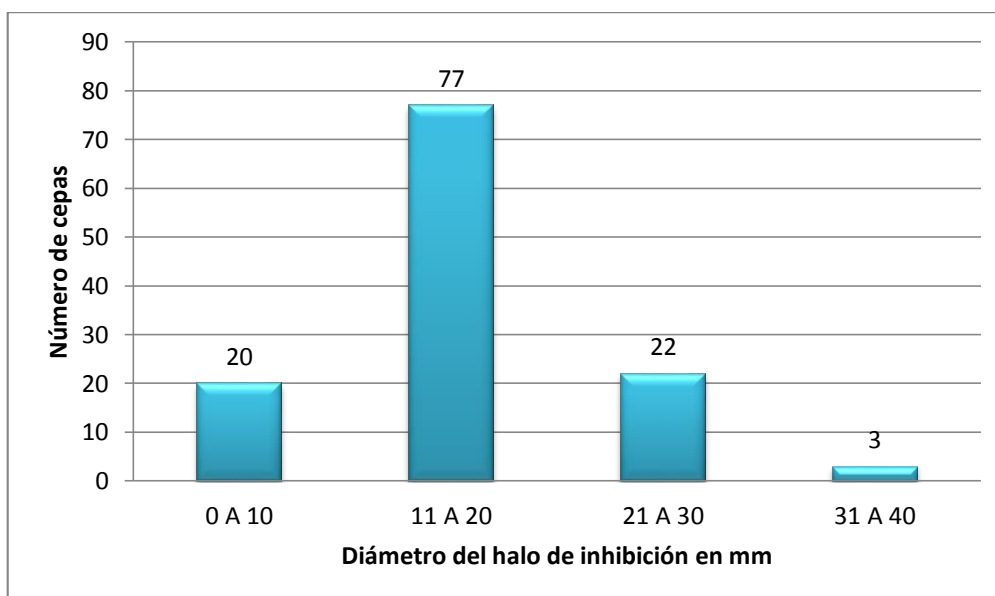


Figura 4. Comportamiento de las cepas frente a 16 000 ppm de níquel

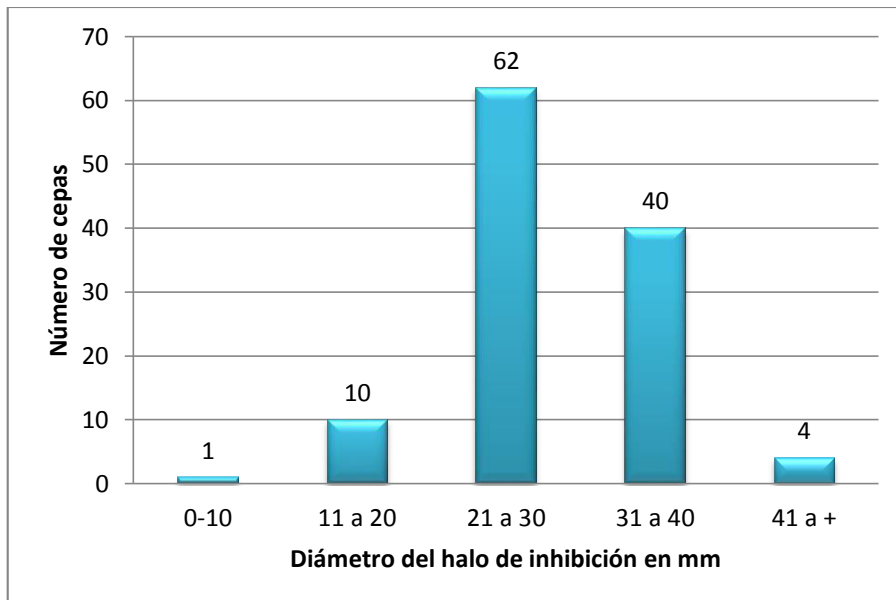


Figura 5. Comportamiento de las cepas frente a 36 000 ppm de cromo

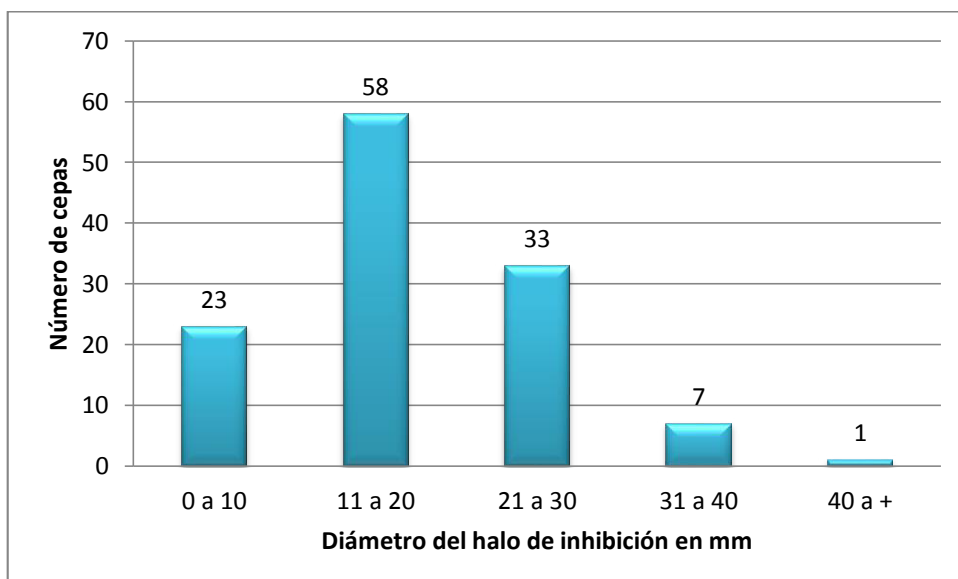


Figura 6. Comportamiento de las cepas frente a 800 ppm de cadmio

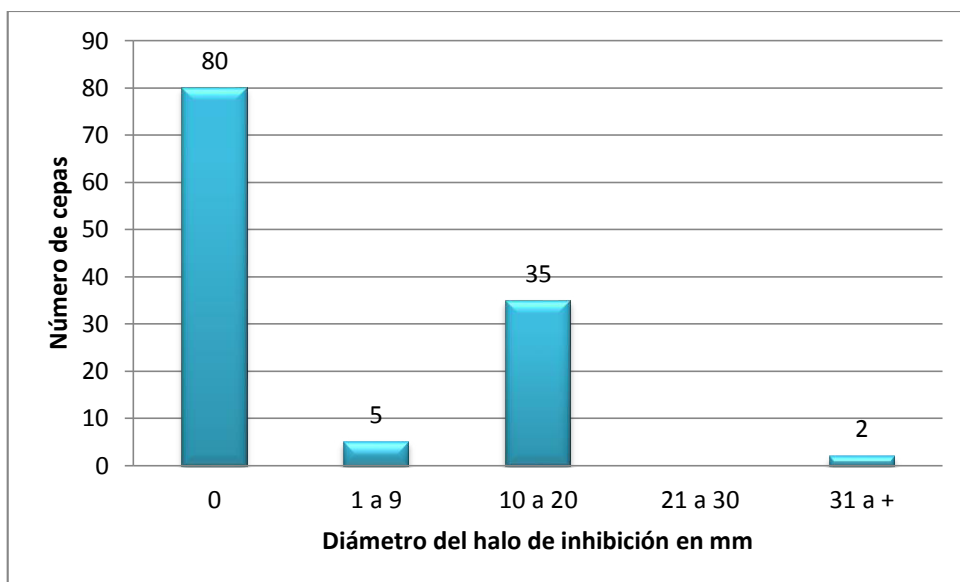


Figura 7. Comportamiento de las cepas frente a 32 000 ppm de plomo

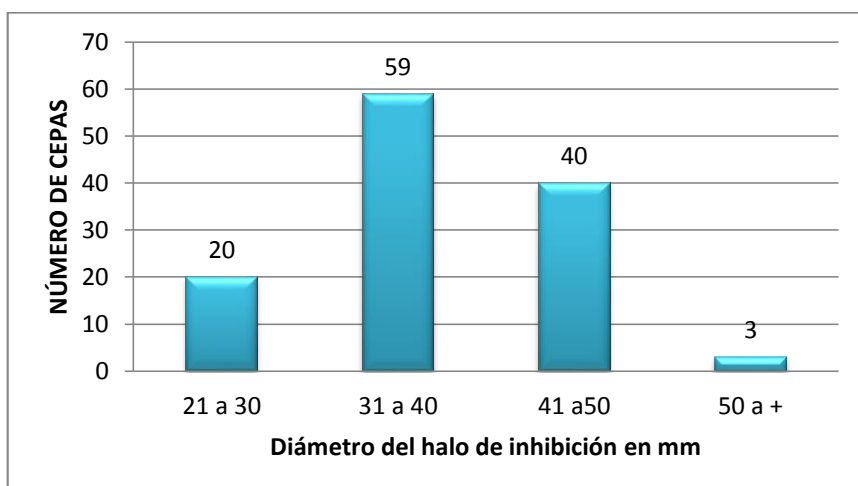


Figura 8. Comportamiento de las cepas frente a 500 ppm de mercurio

Producto de esta evaluación se seleccionaron 27 cepas resistentes a dos y tres metales pesados, en base a la distribución normal de frecuencias de acuerdo al tamaño del halo de inhibición de crecimiento frente a cada metal. Las cepas seleccionadas tenían cuatro patrones de dos marcadores: PbZn (1), NiPb (7), NiCd

(1), CdPb (9) y un solo patrón con tres marcadores : NiCdPb (9); como podemos observar en la tabla 3 y los niveles de resistencia exhibidos por la cepa elegida, en la tabla 4.

Tabla 3. Patrones de resistencia frente a los metales pesados ensayados

| Marcadore N° de | | cepas | | | | | | | | |
|-----------------|---|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|-----------------|
| Pb Zn | 1 | XV | | | | | | | | |
| Ni Pb | 7 | XXT2 | XVIII | M C Cu | T43 | K4A 2 | M12-2 | MIA 2S | | |
| Ni Cd | 1 | MIA 1S | | | | | | | | |
| Cd Pb | 9 | M12 2 | BT2 2 | M8 1 | MIA 3S | 10 51 | M4 1 | M5A 3S | K3A 2b | MO ₃ |
| Ni Cd Pb | 9 | XXXIV | XXVII | XXII | XIX | VII | M5A 4S | M1A 2S | 1 10 | M8A 2T |

Tabla 4. Medición de los halos de inhibición en mm para Cd (II) y Pb (II) luego de las 48 horas de incubación.

| METAL | CONCENTRACIÓN (ppm) | HALO INHIBICIÓN (mm) | |
|--------|------------------------|--|-----------------------------------|
| | | Cepa control | Cepa silvestre |
| | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 | <i>Serratia marcescens</i> M8A-2T |
| Plomo | 4 000 | 0 | 0 |
| | 8 000 | 0 | 0 |
| | 16 000 | 11 | 0 |
| | 32 000 | 14 | 12 |
| Cadmio | 200 | 0 | 0 |
| | 400 | 0 | 0 |
| | 800 | 10 | 0 |

Fuente: Ballardo, 2013

VII.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO

La cinética de crecimiento fue evaluada en las 18 cepas resistentes a cadmio y plomo en función de producción de biomasa y velocidad de crecimiento (μ), pues éstos son los parámetros importantes para la producción de biosorbentes; tal como se muestra desde la figura 9 hasta la figura 24.

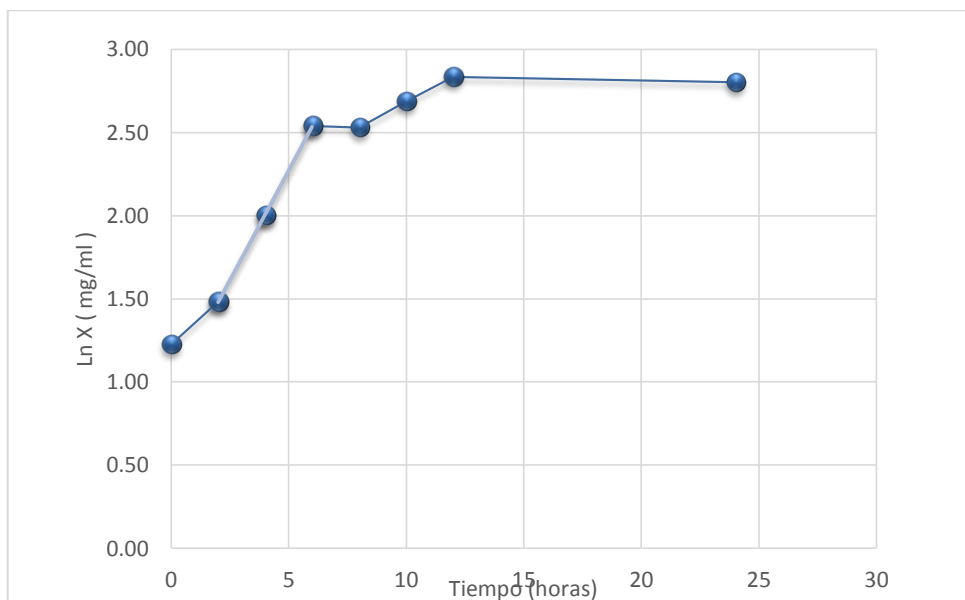


Figura 9. Cinética de crecimiento de la cepa XV

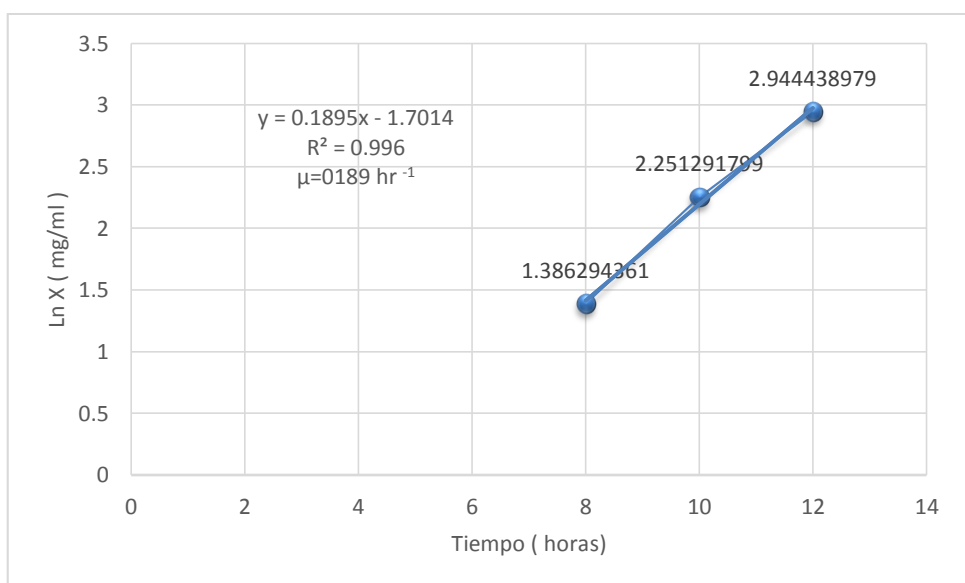


Figura 10. Linealización de la fase logarítmica de la cepa XV

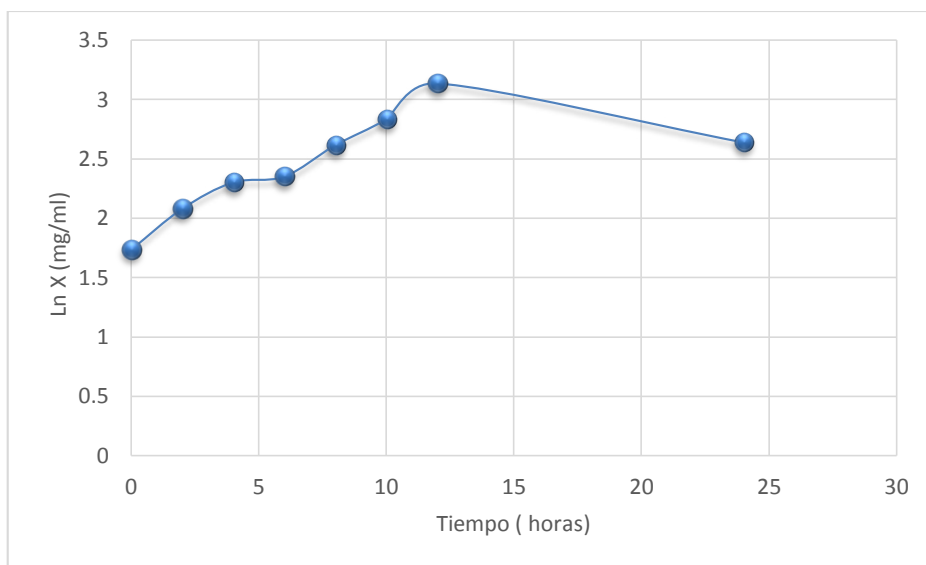


Figura 11. Cinética de crecimiento de la cepa XXXIV

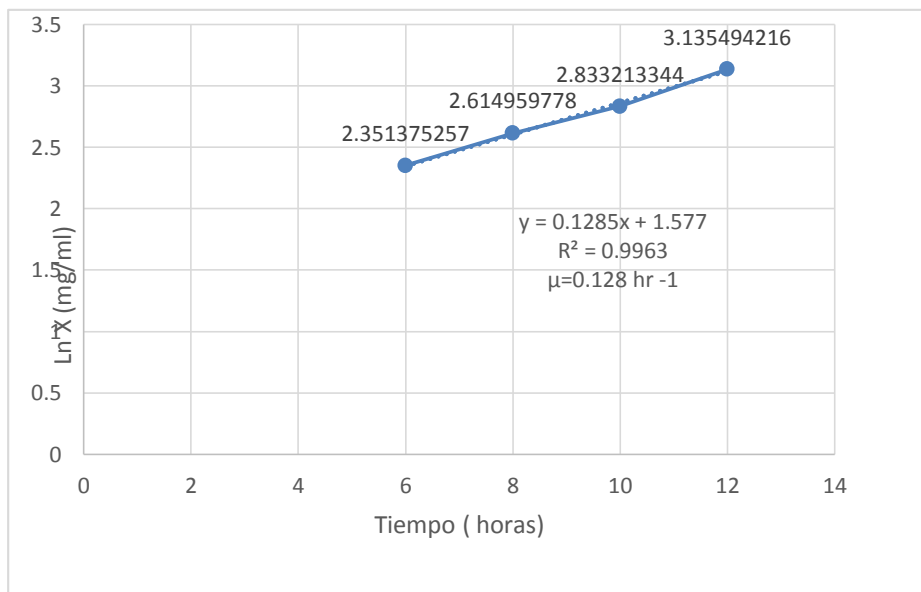


Figura 12. Linealización de la fase logarítmica de la cepa XXXIV

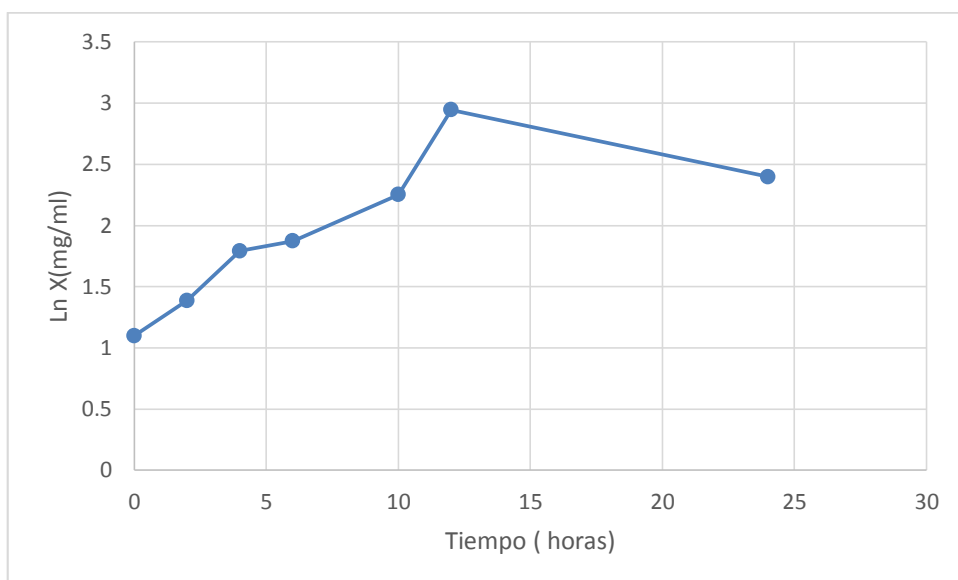


Figura 13. Cinética de crecimiento de la cepa XXII

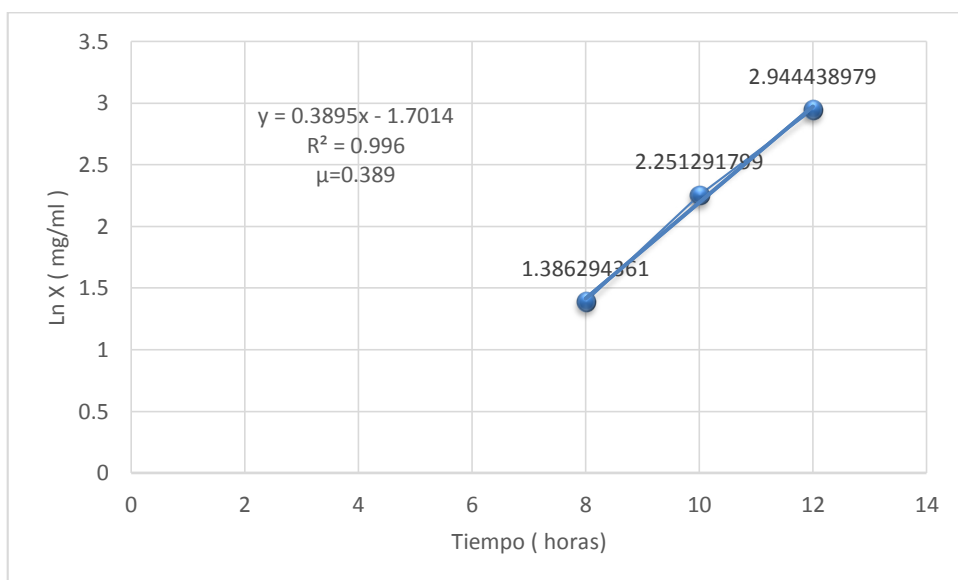


Figura 14. Linealización de la fase logarítmica de crecimiento de la cepa XXII

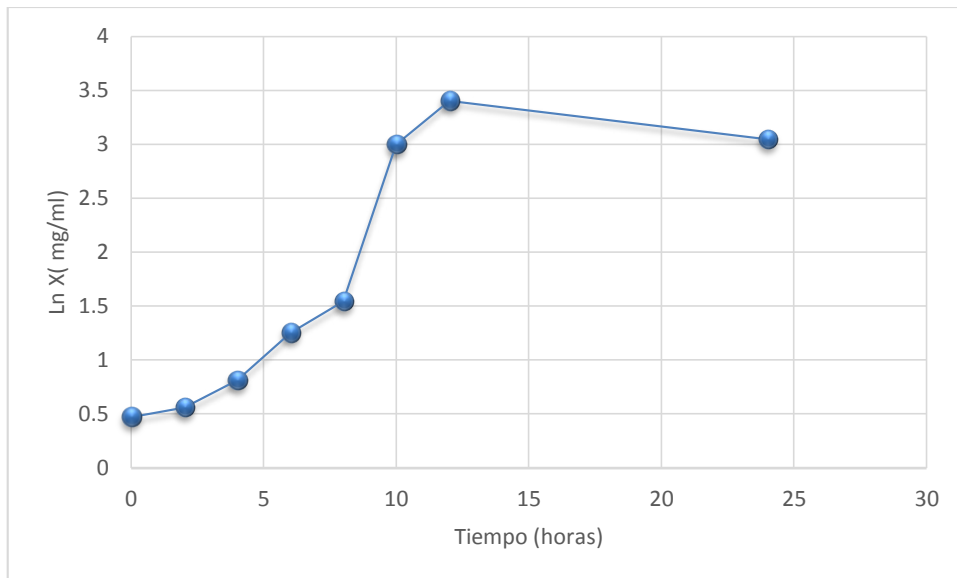


Figura 15. Cinética de crecimiento de la cepa XIX

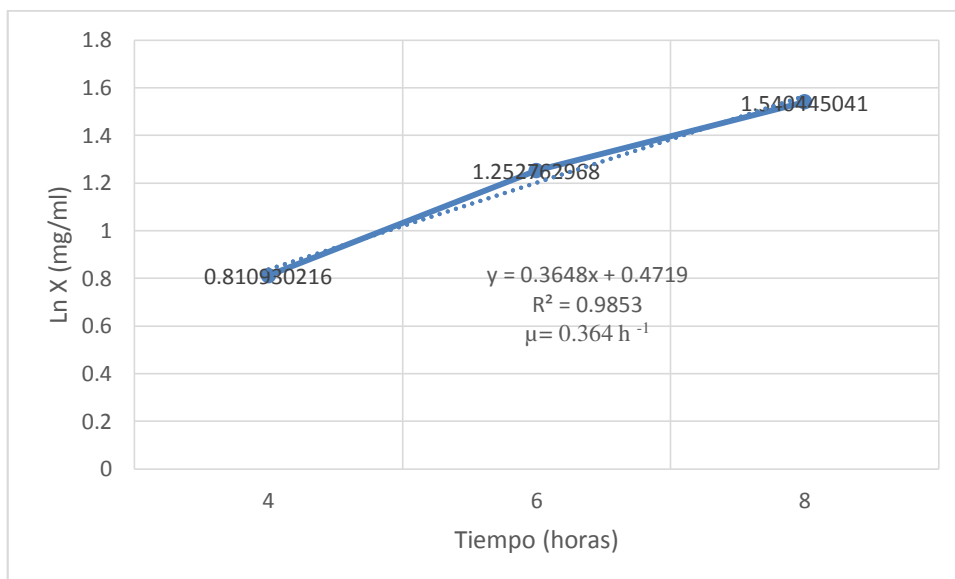


Figura 16. Linealización de la fase logarítmica de la cepa XIX

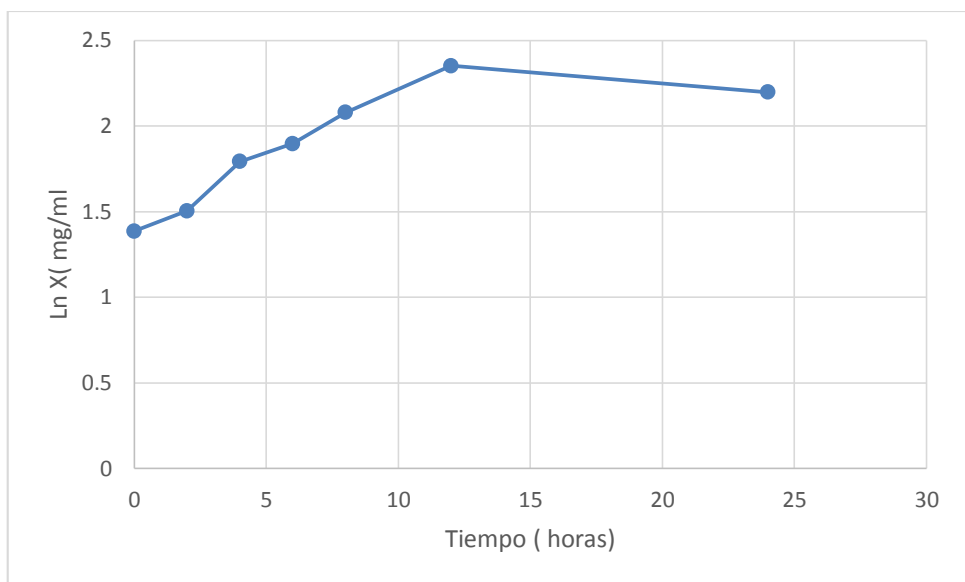


Figura 17. Cinética de crecimiento de la cepa VII

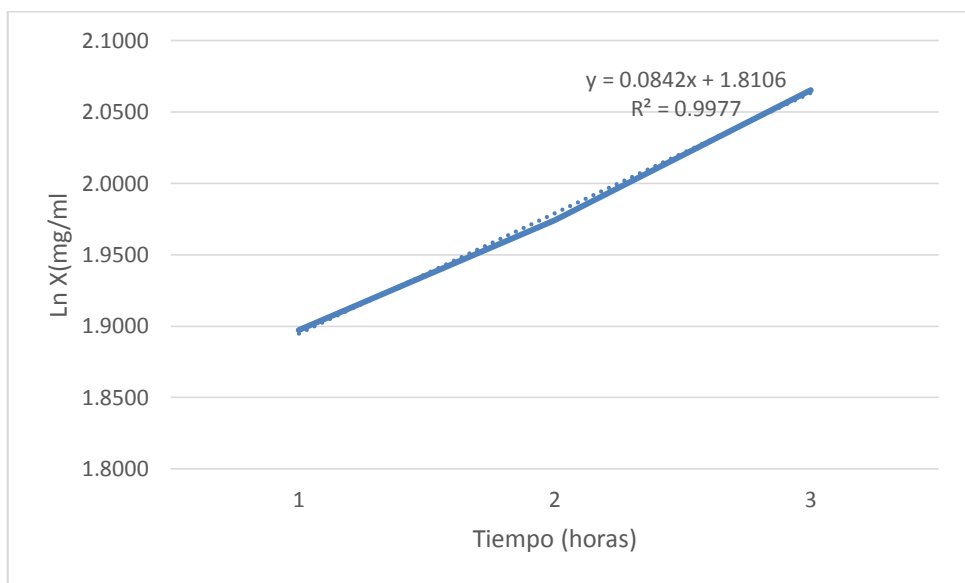


Figura 18. Linealización de la fase logarítmica de la cepa VII

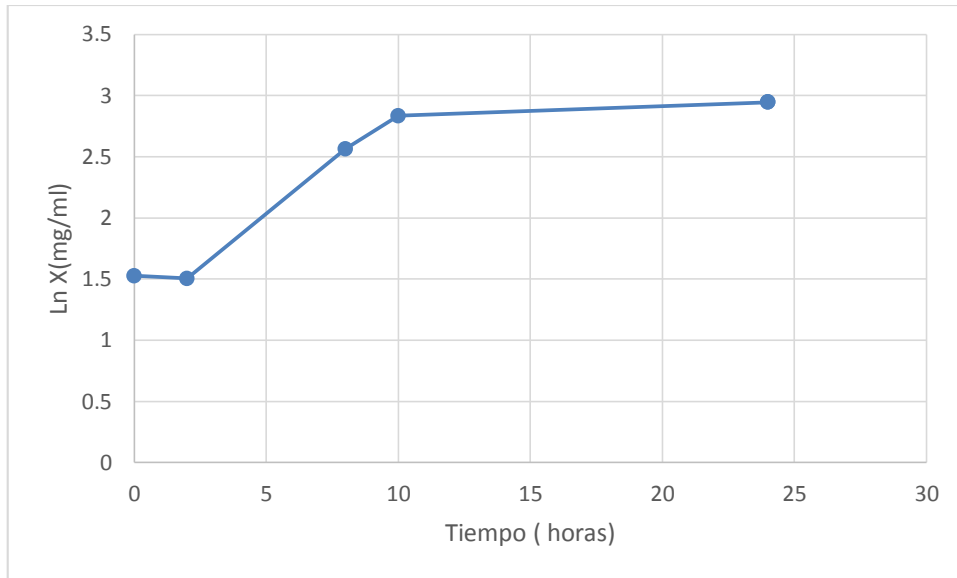


Figura 19. Cinética de crecimiento de la cepa M5A-4S

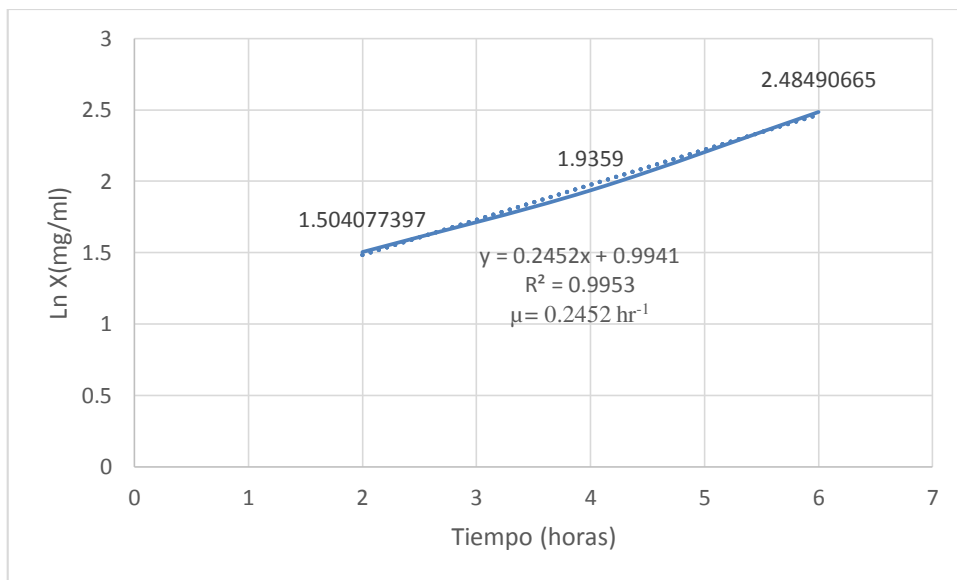


Figura 20. Linealización de la fase logarítmica de la cepa M5A-4S

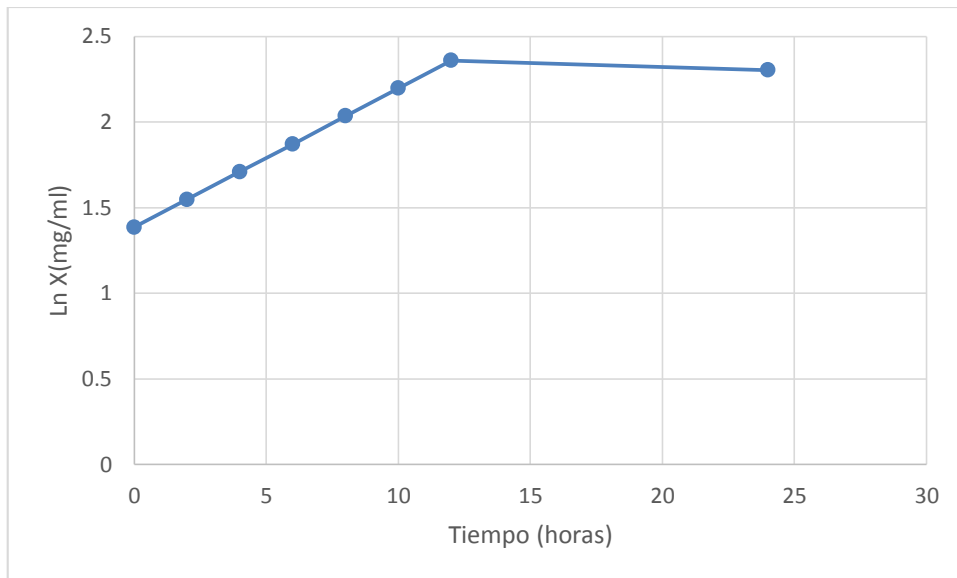


Figura 21. Cinética de crecimiento de la cepa 1 10

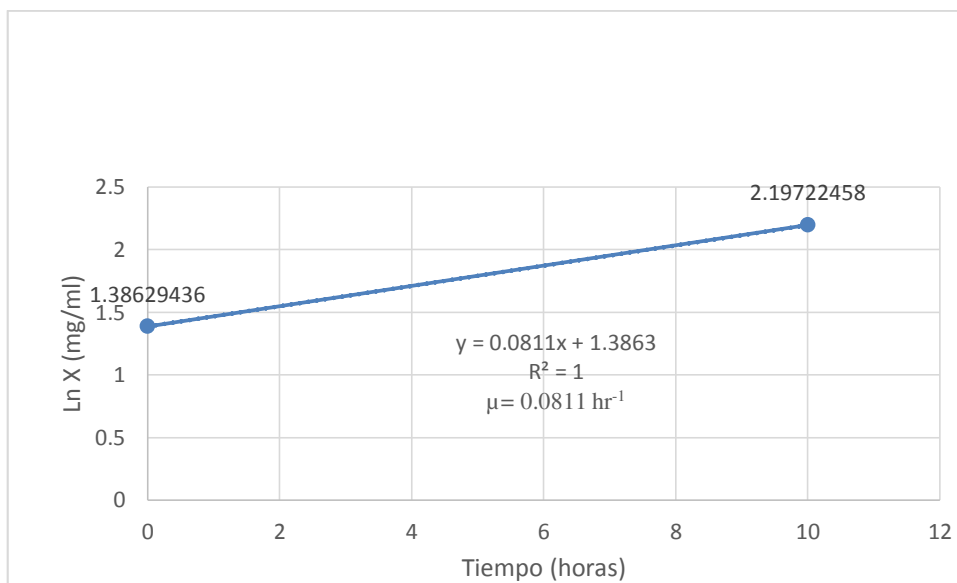


Figura 22. Linealización de la fase logarítmica de la cepa 1 10

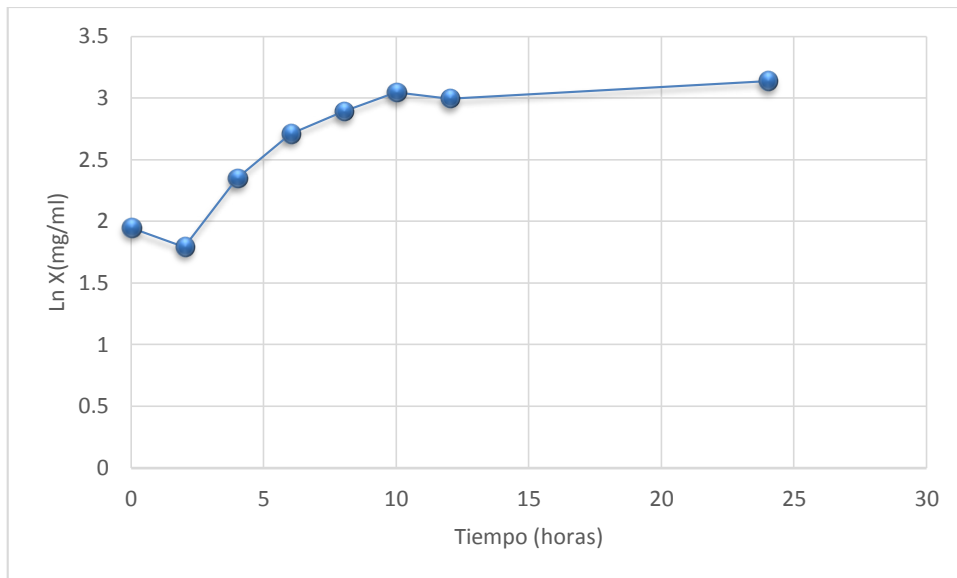


Figura 23. Cinética de crecimiento de la cepa M8A-2T

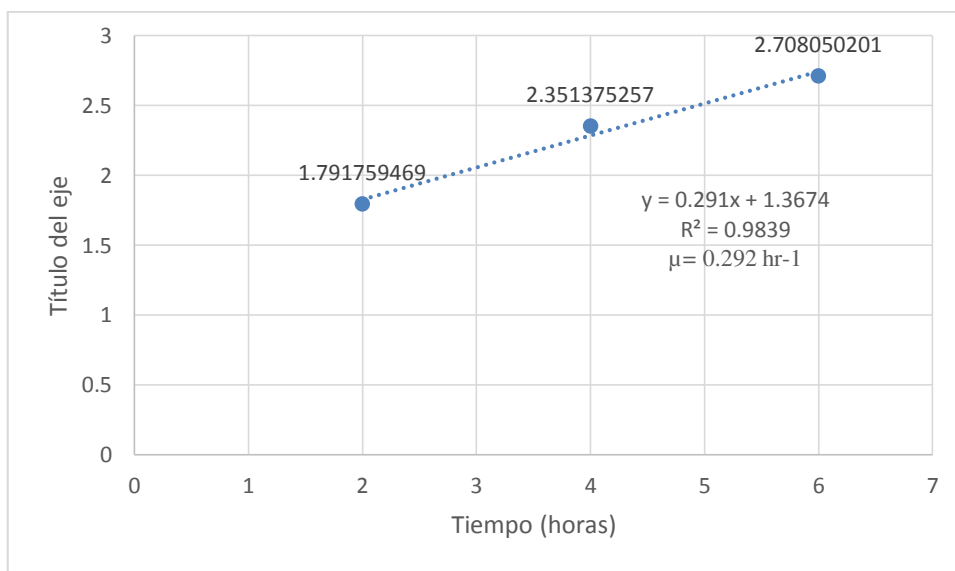


Figura 24. Linealización de la fase logarítmica de la cepa M8A-2T

Tabla 5. Resumen de los datos de producción de biomasa

| CEPAS | XV | XXXIV | XXII | XIX | VII | M5A4S | 1 10 | M8A2T |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|
| Biomasa (mg/ml) | 17 | 20 | 16 | 12 | 10.5 | 13 | 16 | 23 |
| μ (hr^{-1}) | 0,263 | 0,128 | 0,189 | 0,364 | 0,0456 | 0,2452 | 0,081 | 0292 |

Como se aprecia en la tabla 5, la cepa con mayor producción de biomasa (23 mg/ml) es la cepa M8A-2T por tanto la elegimos para las pruebas de biosorción, y para determinar la naturaleza física y genética de la resistencia.

VII.4 NATURALEZA GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A LOS METALES PESADOS

La cepa M8A-2T con mayor producción de biomasa y resistencia a metales pesados, no mostró presencia de plásmidos como puede apreciarse en el carril 18 de la figura 25, lo cual nos lleva a deducir que la resistencia es de naturaleza cromosómica.

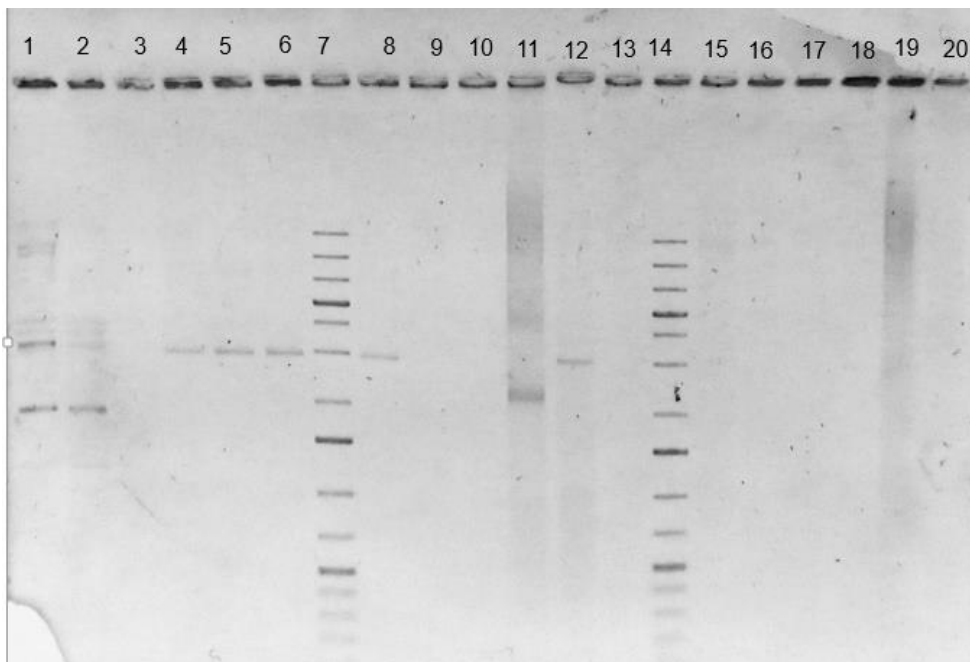


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa para la determinación de la presencia de plásmidos. Las cepas ensayadas y los pesos moleculares respectivos son como sigue:

| | | |
|----|---------------|---|
| 1 | 332 | 21,3kb, 15,6kb, 11,1kb, 8,6kb, 7,4kb, 4,2kb, 3,8kb, 3,3kb, 1,9kb, 1,3kb |
| 2 | 332 | |
| 3 | XV | |
| 4 | T43 | 2,9kb |
| 5 | M1A-1S | 2,9kb |
| 6 | XXXIV | 2,9kb |
| 7 | <i>Ladder</i> | |
| 8 | M12-2 | 2,9kb |
| 9 | XXVII | |
| 10 | XXII | |
| 11 | XIX | 4kb, 2kb |
| 12 | VII | 2,9kb |
| 13 | M1A-3S | |
| 14 | <i>Ladder</i> | |
| 15 | 1051 | 14,2kb |
| 16 | M41 | |
| 17 | M1A-2S | |
| 18 | M8A-2T | |
| 19 | 1 10 | |

VII.5 DETERMINACIÓN DEL pH ÓPTIMO PARA LA REMOCIÓN DE PLOMO Y CADMIO

El pH 3 resultó óptimo para la remoción de cadmio, pues se logró captar el 99,97 % del cadmio en solución, como lo apreciamos en la figura 26. Al analizar la significancia de los porcentajes de remoción en función del pH, por el ANOVA se encontró un nivel de significancia menor a $p < 0,05$ lo que confirma que existen diferencias significativas entre los niveles de remoción de cadmio en los diferentes pH probados según lo podemos ver en la tabla 7. Las pruebas de Tukey nos dicen que a pH 7 y 11 no hay diferencias significativas mientras que pH 3,5 y 9 si las hay como vemos en la tabla 7.

En el caso de plomo también existen diferencias significativas de acuerdo al ANOVA pero no hay diferencias significativas entre la remoción a pH 3 y 11 además de 7 y 9 como observamos en la figura 27 y las tablas 8 y 9.

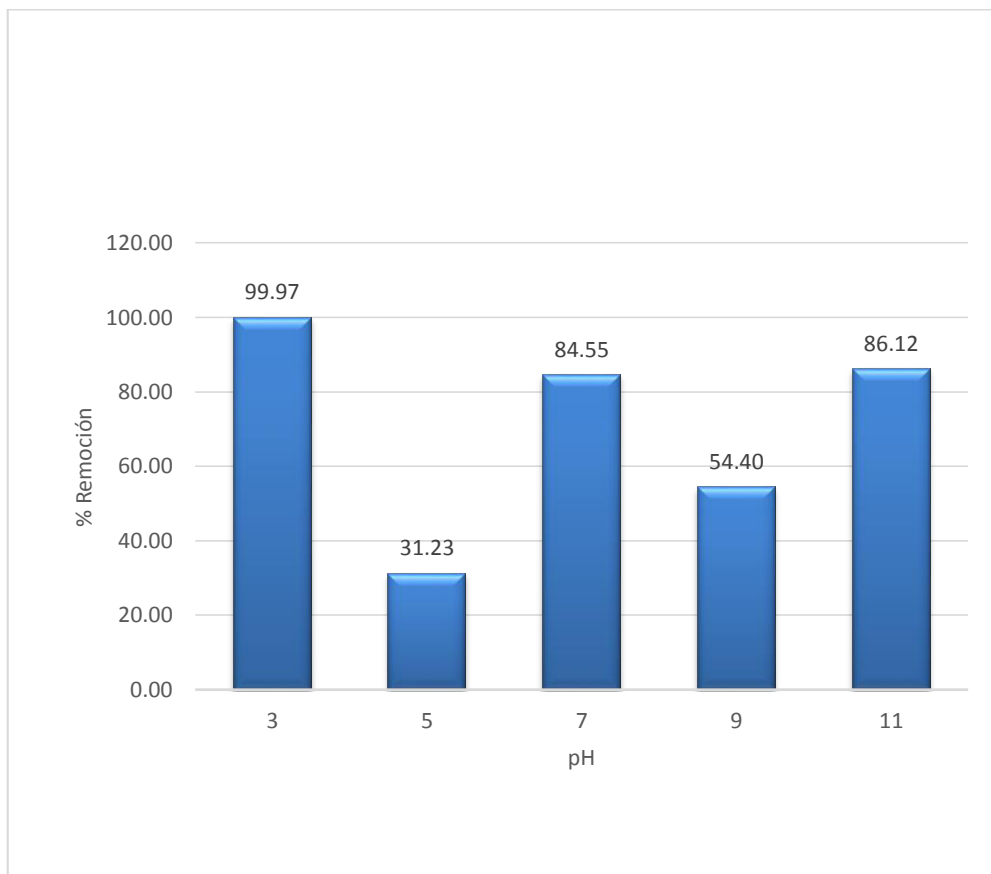


Figura 26. Efecto del pH sobre la biosorción de cadmio de la cepa M8A-2T

Tabla 6. Prueba de ANOVA para la remoción de cadmio a diferentes pH

ANOVA de un factor

Porcentaje de remocion de cadmio

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------------|-------------------|----|------------------|----------|------|
| Inter-grupos | 9270,330 | 4 | 2317,582 | 2723,065 | ,000 |
| Intra-grupos | 8,511 | 10 | ,851 | | |
| Total | 9278,841 | 14 | | | |

Tabla 7: Pruebas Pos análisis de Tukey para la remoción de cadmio a diferentes pH

Pruebas post hoc

| Comparaciones múltiples | | | | | | |
|--|--------|--------|----------------------------|--------------|------|-------------------------------------|
| Variable dependiente: Porcentaje de remocion de cadmio | | | | | | |
| | (I) pH | (J) pH | Diferencia de medias (I-J) | Error típico | Sig. | Intervalo de ... Limite inferior |
| HSD de Tukey | 3 | 5 | 68,40667 [*] | ,75326 | ,000 | 65,9276 |
| | | 7 | 15,08667 [*] | ,75326 | ,000 | 12,6076 |
| | | 9 | 45,23667 [*] | ,75326 | ,000 | 42,7576 |
| | | 11 | 13,49000 [*] | ,75326 | ,000 | 11,0110 |
| | 5 | 3 | -68,40667 [*] | ,75326 | ,000 | -70,8857 |
| | | 7 | -53,32000 [*] | ,75326 | ,000 | -55,7990 |
| | | 9 | -23,17000 [*] | ,75326 | ,000 | -25,6490 |
| | | 11 | -54,91667 [*] | ,75326 | ,000 | -57,3957 |
| | 7 | 3 | -15,08667 [*] | ,75326 | ,000 | -17,5657 |
| | | 5 | 53,32000 [*] | ,75326 | ,000 | 50,8410 |
| | | 9 | 30,15000 [*] | ,75326 | ,000 | 27,6710 |
| | | 11 | -1,59667 | ,75326 | ,284 | -4,0757 |
| | 9 | 3 | -45,23667 [*] | ,75326 | ,000 | -47,7157 |
| | | 5 | 23,17000 [*] | ,75326 | ,000 | 20,6910 |
| | | 7 | -30,15000 [*] | ,75326 | ,000 | -32,6290 |
| | | 11 | -31,74667 [*] | ,75326 | ,000 | -34,2257 |
| | 11 | 3 | -13,49000 [*] | ,75326 | ,000 | -15,9690 |
| | | 5 | 54,91667 [*] | ,75326 | ,000 | 52,4376 |
| | | 7 | 1,59667 | ,75326 | ,284 | -,8824 |
| | | 9 | 31,74667 [*] | ,75326 | ,000 | 29,2676 |

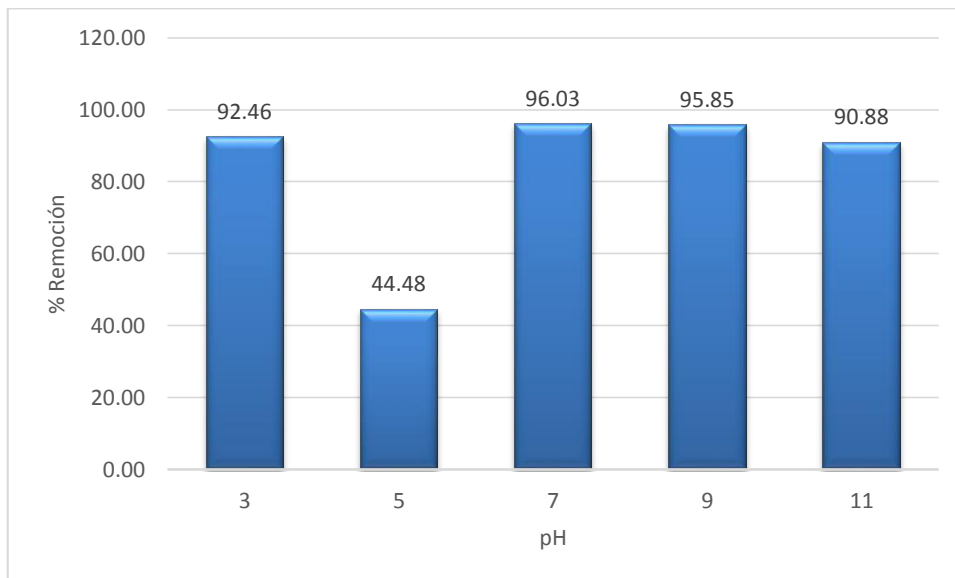


Figura 27. Efecto del pH sobre la biosorción de plomo de la cepa M8A-2T

Tabla 8. Prueba de ANOVA para la biosorción de plomo a diferentes pH

| ANOVA de un factor | | | | | |
|--------------------|-------------------|----|------------------|----------|------|
| % Remoción Plomo | | | | | |
| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| Inter-grupos | 5920,648 | 4 | 1480,162 | 1338,173 | ,000 |
| Intra-grupos | 11,061 | 10 | 1,106 | | |
| Total | 5931,709 | 14 | | | |

Tabla 9. Prueba pos análisis de Tukey para la remoción de plomo según el pH

| Variable dependiente: % Remoción Plomo | | | | | | |
|--|--------|----------------------------|--------------|-------|--------------------------------|-----------------|
| HSD de Tukey | | | | | | |
| (I) pH | (J) pH | Diferencia de medias (I-J) | Error típico | Sig. | Intervalo de confianza al 95 % | |
| | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| 3 | 5 | 47,153 [*] | ,859 | ,000 | 44,33 | 49,98 |
| | 7 | -4,847 [*] | ,859 | ,002 | -7,67 | -2,02 |
| | 9 | -4,847 [*] | ,859 | ,002 | -7,67 | -2,02 |
| | 11 | 1,153 | ,859 | ,673 | -1,67 | 3,98 |
| 5 | 3 | -47,153 [*] | ,859 | ,000 | -49,98 | -44,33 |
| | 7 | -52,000 [*] | ,859 | ,000 | -54,83 | -49,17 |
| | 9 | -52,000 [*] | ,859 | ,000 | -54,83 | -49,17 |
| | 11 | -46,000 [*] | ,859 | ,000 | -48,83 | -43,17 |
| 7 | 3 | 4,847 [*] | ,859 | ,002 | 2,02 | 7,67 |
| | 5 | 52,000 [*] | ,859 | ,000 | 49,17 | 54,83 |
| | 9 | ,000 | ,859 | 1,000 | -2,83 | 2,83 |
| | 11 | 6,000 [*] | ,859 | ,000 | 3,17 | 8,83 |
| 9 | 3 | 4,847 [*] | ,859 | ,002 | 2,02 | 7,67 |
| | 5 | 52,000 [*] | ,859 | ,000 | 49,17 | 54,83 |
| | 7 | ,000 | ,859 | 1,000 | -2,83 | 2,83 |
| | 11 | 6,000 [*] | ,859 | ,000 | 3,17 | 8,83 |
| 11 | 3 | -1,153 | ,859 | ,673 | -3,98 | 1,67 |
| | 5 | 46,000 [*] | ,859 | ,000 | 43,17 | 48,83 |
| | 7 | -6,000 [*] | ,859 | ,000 | -8,83 | -3,17 |
| | 9 | -6,000 [*] | ,859 | ,000 | -8,83 | -3,17 |

VII.6 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE ENFRENTAMIENTO PARA LA REMOCIÓN DE CADMIO Y PLOMO

En la figura 28 podemos observar que el mayor porcentaje de remoción de cadmio (92,60 %) se produce a los 120 minutos de enfrentamiento entre la biomasa y el metal. Al analizar estadísticamente este resultados por el método de ANOVA de un paso que figura en la tabla 10, comprobamos que no existen diferencias significativas al obtener $p = 0,285$ y ésto se apoya en el valor del factor estadístico F de la tabla de varianza que tampoco es significativo y nos indica que el tiempo de

exposición no influye en la capacidad de remoción de cadmio. Respecto a la remoción de plomo en la figura 29 observamos que a los 90 minutos de exposición, hay un 83,60 % de remoción de plomo. Al analizar estadísticamente estos resultados obtenemos un $p=,000$ que es menor a $p< ,05$ por lo tanto si existen diferencias significativas entre los tiempos ensayados. Con la HSD de Tukey encontramos que existen diferencias entre los tratamientos de 15 y 30 minutos pero no en el resto de tratamientos.

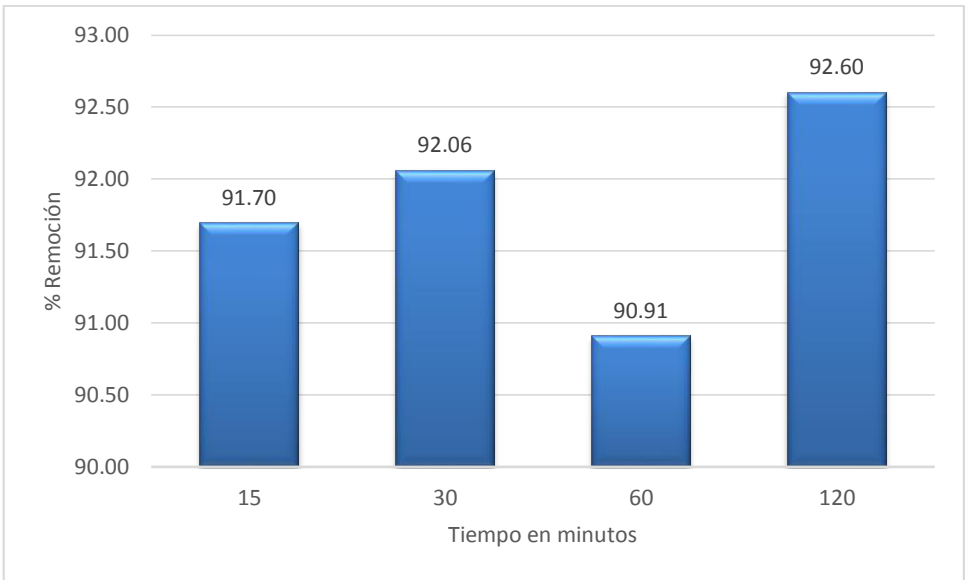


Figura 28. Efecto del tiempo sobre la biosorción de cadmio de la cepa M8A-2T

Tabla 10. Prueba de ANOVA para los datos obtenidos de biosorción de cadmio y tiempo de exposición

ANOVA de un factor

[DataSet0]

ANOVA de un factor

Porcentaje de remoción de cadmio

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------------|-------------------|----|------------------|-------|------|
| Inter-grupos | 4,525 | 3 | 1,508 | 1,508 | ,285 |
| Intra-grupos | 8,000 | 8 | 1,000 | | |
| Total | 12,525 | 11 | | | |

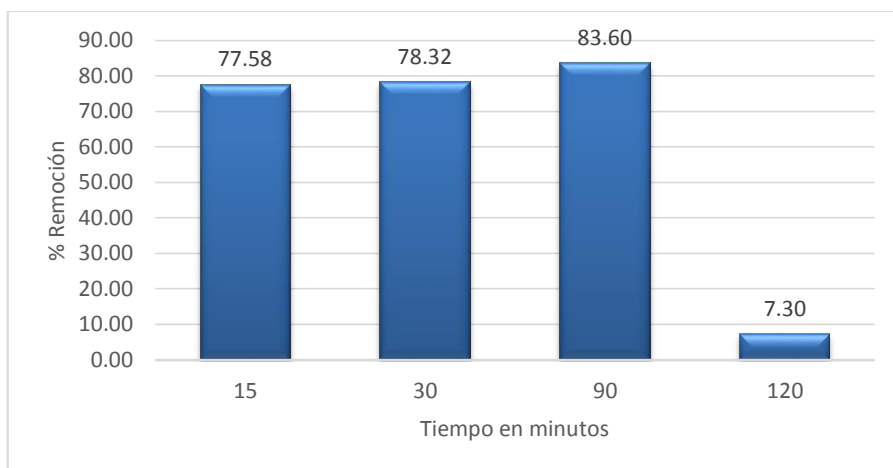


Figura 29. Efecto del tiempo sobre la biosorción de plomo de la cepa M8A-2T

Tabla 11. Prueba de ANOVA para la biosorción de plomo y el tiempo de exposición

ANOVA de un factor

VAR00002

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------------|-------------------|----|------------------|----------|------|
| Inter-grupos | 11902,106 | 3 | 3967,369 | 3967,369 | ,000 |
| Intra-grupos | 8,000 | 8 | 1,000 | | |
| Total | 11910,106 | 11 | | | |

Tabla 12. Prueba pos análisis de Tukey para la remoción de plomo y el tiempo de exposición

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: VAR00002

| | (I) VAR00001 | (J) VAR00001 | Diferencia de medias (I-J) | Error típico | Sig. |
|--------------|--------------|--------------|----------------------------|--------------|------|
| HSD de Tukey | 15 | 30 | -,74000 | ,81650 | ,802 |
| | | 90 | -6,02000* | ,81650 | ,000 |
| | | 120 | 70,28000* | ,81650 | ,000 |
| | 30 | 15 | ,74000 | ,81650 | ,802 |
| | | 90 | -5,28000* | ,81650 | ,001 |
| | | 120 | 71,02000* | ,81650 | ,000 |
| | 90 | 15 | 6,02000* | ,81650 | ,000 |
| | | 30 | 5,28000* | ,81650 | ,001 |
| | | 120 | 76,30000* | ,81650 | ,000 |
| | 120 | 15 | -70,28000* | ,81650 | ,000 |
| | | 30 | -71,02000* | ,81650 | ,000 |
| | | 90 | -76,30000* | ,81650 | ,000 |

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

VII.7 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE CADMIO Y PLOMO

La concentración inicial de los metales demuestra que a mayor concentración inicial de metales hay mayor porcentaje de remoción.

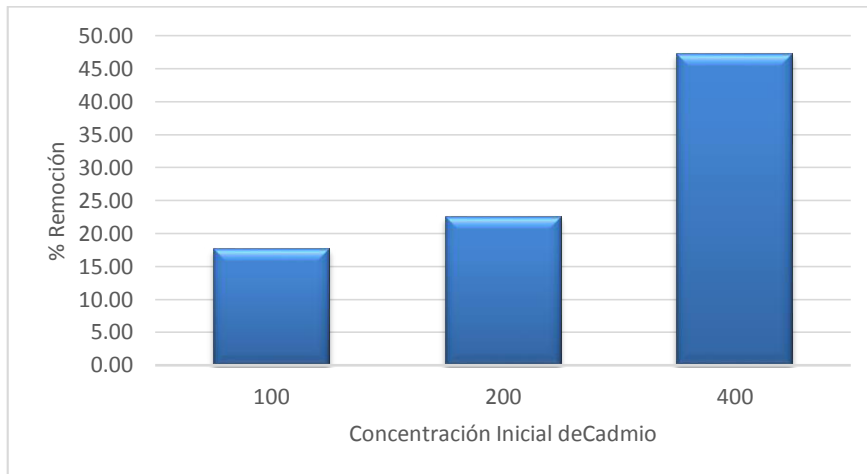


Figura 30. Efecto de la concentración Inicial de cadmio sobre la biosorción de la cepa M8A-2T

Tabla 13. Prueba de ANOVA para la remoción de cadmio según la concentración inicial de metales

ANOVA de un factor

Porcentaje de remocion de cadmio

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------------|-------------------|----|------------------|---------|------|
| Inter-grupos | 1510,656 | 2 | 755,328 | 755,328 | ,000 |
| Intra-grupos | 6,000 | 6 | 1,000 | | |
| Total | 1516,656 | 8 | | | |

Tabla 14. Prueba pos análisis de Tukey para la remoción de cadmio y concentración inicial de metales

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Porcentaje de remocion de cadmio

| | | (I) Concentracion de cadmio | (J) Concentracion de cadmio | Sig. | Intervalo de ... Límite inferior |
|--------------|-----|-----------------------------|-----------------------------|------|-------------------------------------|
| HSD de Tukey | 100 | 200 | | ,000 | 22,2048 |
| | | 400 | | ,000 | 27,0948 |
| | 200 | 100 | | ,000 | -27,2152 |
| | | 400 | | ,002 | 2,3848 |
| | 400 | 100 | | ,000 | -32,1052 |
| | | 200 | | ,002 | -7,3952 |

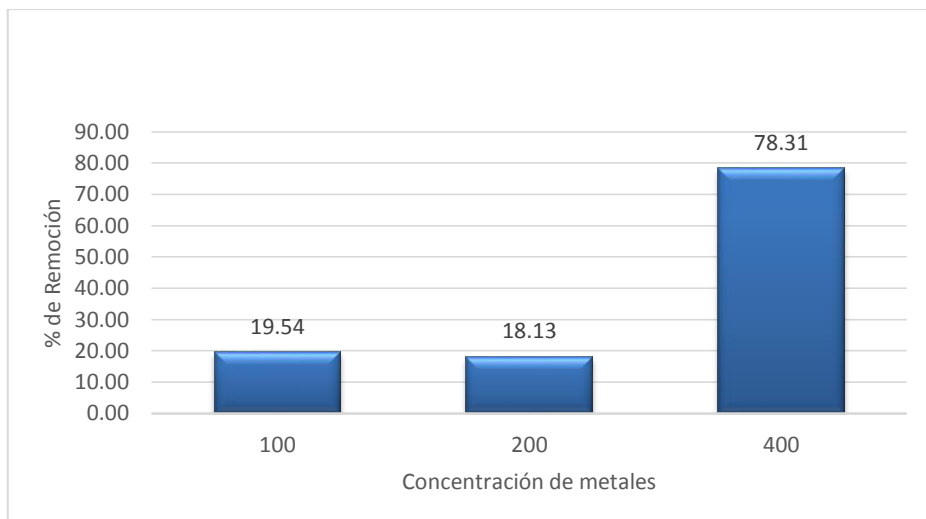


Figura 31. Efecto de la concentración inicial de plomo sobre la biosorción de la cepa M8A-2T

Tabla 15. Prueba de ANOVA para la remoción de plomo según concentración inicial de metal

ANOVA de un factor

Porcentaje de remocion de plomo

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------------|-------------------|----|------------------|----------|------|
| Inter-grupos | 7194,253 | 2 | 3597,127 | 3597,127 | ,000 |
| Intra-grupos | 6,000 | 6 | 1,000 | | |
| Total | 7200,253 | 8 | | | |

Tabla 16. Prueba pos análisis de Tukey para la remoción de plomo según concentración inicial de metal

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Porcentaje de remocion de plomo

| | (I) Concentracion de plomo | (J) Concentracion de plomo | Sig. | Intervalo de ... |
|--------------|----------------------------|----------------------------|------|------------------|
| | | | | Límite inferior |
| HSD de Tukey | 100 | 200 | ,873 | -2,0952 |
| | | 400 | ,000 | -62,2752 |
| | 200 | 100 | ,873 | -2,9152 |
| | | 400 | ,000 | -62,6852 |
| | 400 | 100 | ,000 | 57,2648 |
| | | 200 | ,000 | 57,6748 |
| Scheffé | 100 | 200 | ,884 | -2,2087 |
| | | 400 | ,000 | -62,3887 |
| | 200 | 100 | ,884 | -3,0287 |
| | | 400 | ,000 | -62,7987 |
| | 400 | 100 | ,000 | 57,1513 |
| | | 200 | ,000 | 57,5613 |

VII.8 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE BIOMASA

La biomasa en concentración de 1 mg/ml resultó óptima para la remoción de 100 ppm de cadmio y plomo pues se logró remover 99,96 % y 93,93 %, respectivamente, como se aprecia en las tablas 17 y 18.

Tabla 17. Porcentaje de remoción de cadmio en función de la concentración de biomasa

| Biomasa | Cadmio | | |
|-------------|--------|-------|------------|
| mg/ml | Co | Cf | % Remoción |
| 0,1 | 91,7 | 50,48 | 44,950 |
| 0,01 | 91,7 | 48,43 | 47,186 |
| 1 | 278,9 | 0,09 | 99,967 |

Tabla 18. Porcentaje de remoción de plomo en función de la concentración de biomasa

| Biomasa | Plomo | Cf | % |
|-------------|--------|-------|----------|
| mg/ml | Co | | Remoción |
| 0,1 | 103,03 | 57,76 | 43,9300 |
| 0,01 | 103,03 | 55,71 | 45,9200 |
| 1 | 128,05 | 7,77 | 93,9300 |

VII.9 EFECTO DE LA GRANULOMETRÍA EN LA CAPACIDAD DE BIOSORCIÓN

La biomasa fue medida en el microscopio marca Leica DM 750 para determinar el tamaño de malla necesaria para la separación de las mismas; los gránulos se agruparon en grandes los que tenían en promedio 0,114 x 0,139 mm (>100 μ m), medianas las de 0,0727 x 0,0905 mm (75-90 μ m) y pequeñas las que ostentaban 0,02221 x 0,02936 mm (25-49 μ m) según se muestra en las figuras 32, 33A, B, C y en la tabla 19.

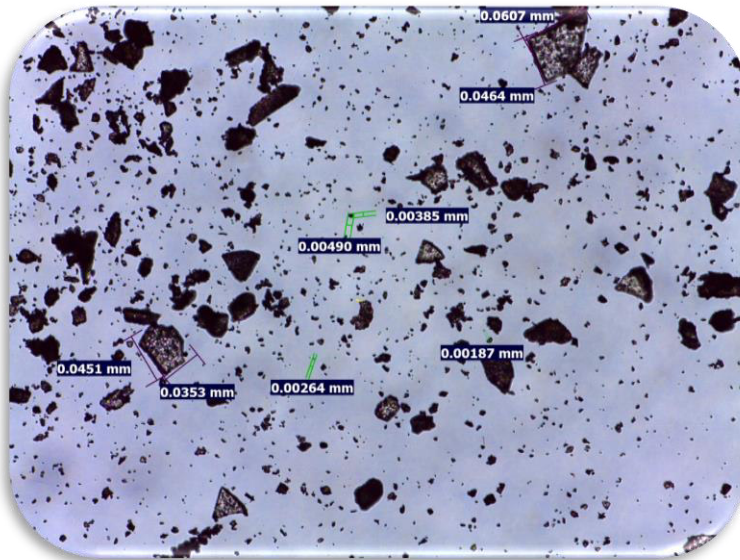
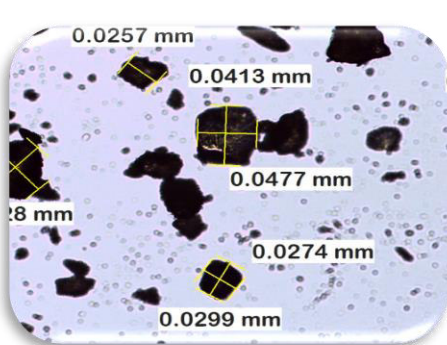
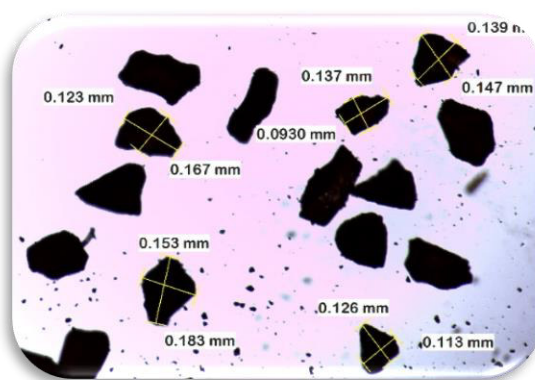
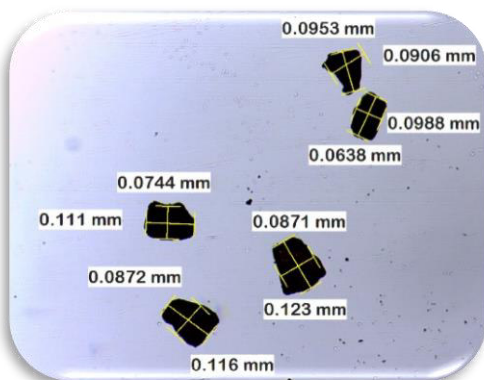


Figura 32. Foto de los diferentes tamaños de partícula observados en la biomasa



A)



B)

C)

Figura 33 A) Observación microscópica de los granos pequeños B) Biomasa de granos medianos y C) Biomasa de granos grandes

Tabla 19. Medidas (en mm) de los diferentes tamaños de grano en la biomasa seca

| | Pequeños | | Medianos | | Grandes | |
|----------|----------|---------|----------|--------|---------|-------|
| | ancho | largo | ancho | largo | ancho | largo |
| | 0,0464 | 0,0607 | 0,0506 | 0,0843 | 0,113 | 0,138 |
| | 0,0353 | 0,0451 | 0,0832 | 0,0936 | 0,115 | 0,141 |
| | 0,0136 | 0,0153 | | | | |
| | 0,0119 | 0,0208 | | | | |
| | 0,00385 | 0,0049 | 0,0843 | 0,0936 | | |
| Promedio | 0,02221 | 0,02936 | 0,0727 | 0,0905 | 0,114 | 0,139 |

Al enfrentar los diferentes tamaños de gránulos con 400 ppm de cadmio y 378,89 ppm de plomo en solución se obtuvo que los gránulos pequeños tenían tanto o más capacidad de biosorción de cadmio que los gránulos grandes, como vemos en la tabla 20, mientras que para el plomo el gránulo pequeño resultó más favorable para el proceso de biosorción (55,99 %) como lo podemos ver en la tabla 21.

Tabla 20. Porcentaje de remoción de cadmio según granulometría de biomasa

| TAMAÑO | PPM | % |
|---------|-----------------|-------|
| | CADMIO REMOCIÓN | |
| CONTROL | 400 | |
| GRANDE | 247 | 38,25 |
| MEDIANO | 299,4 | 25,15 |
| PEQUEÑO | 244,8 | 38,8 |

Tabla 21. Porcentaje de remoción de plomo según granulometría de biomasa

| TAMAÑO | PPM | % |
|---------|----------------|-----------|
| | PLOMO REMOCIÓN | |
| CONTROL | 378,89 | |
| GRANDE | 309,22 | 18,387922 |
| MEDIANO | 247,8 | 34,598432 |
| PEQUEÑO | 166,74 | 55,992504 |

VII.10 DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE EQUILIBRIO

En la figura 34 podemos observar que a los 15 minutos se alcanza el máximo porcentaje de remoción de cadmio ya sea con 100, 200 y 600 ppm del metal y es una isoterma de tipo L. Con estos datos graficamos $1/q$ contra $1/C_e$ para aplicar la ecuación de Langmuir linealizada

$$\frac{1}{q} = \frac{1}{q_{max}} + \frac{1}{b \cdot q_{max} \cdot C_e}$$

donde obtenemos la ordenada al origen $1/Q_{max}$ y la pendiente $1/b \cdot Q_{max}$, con lo cual el Q_{max} es de 417 mg de cadmio / g de biomasa bacteriana . El valor adimensional R_L es de 0,00145653, por lo que se considera un comportamiento isotérmico favorable. Asimismo vemos el R^2 de la figura 35 y nos dice que los datos obtenidos se ajustan en un 98,53 % al modelo propuesto.

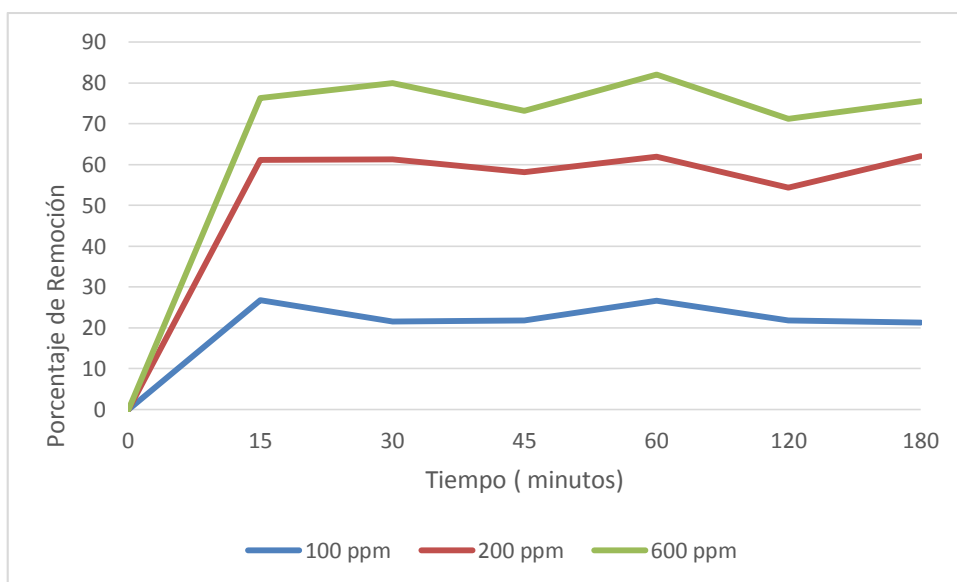


Figura 34. Cinética de biosorción de cadmio

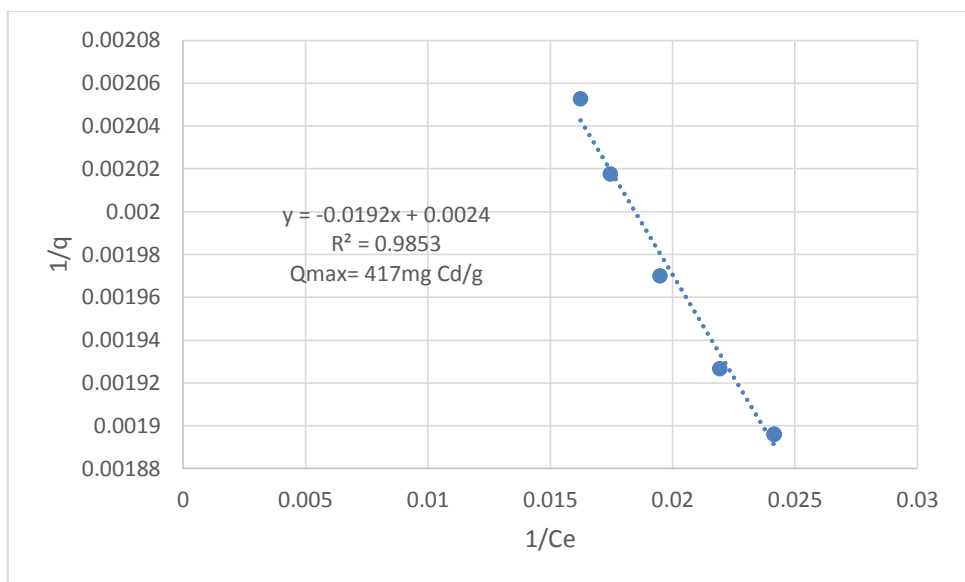


Figura 35. Isotherma de Langmuir para biosorción de cadmio por la cepa M8A-2T

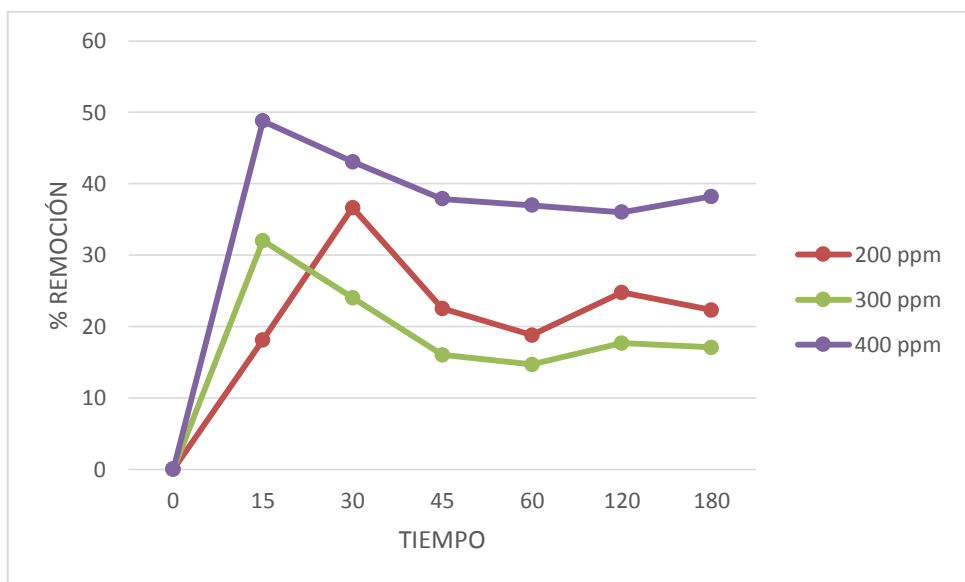


Figura 36. Cinética de biosorción de plomo

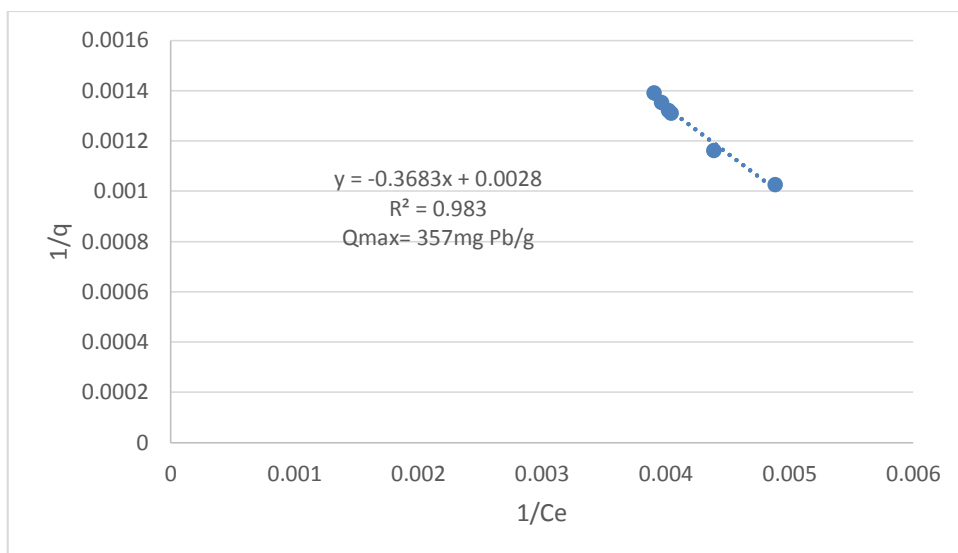


Figura 37. Isoterma de Langmuir para biosorción de plomo por la cepa M8A-2T

Observando la figura 37 respecto a la cinética de biosorción de plomo, es una isoterma de tipo L. A concentraciones de plomo de 200 ppm la saturación se alcanza a los 30 minutos indicando que el proceso es lento por ser una concentración baja para este tipo de sorbente, mientras que a 300 y 400 ppm se alcanza la saturación en 15 minutos. Con los datos de la biosorción a 400 ppm de plomo graficamos $1/q$ contra $1/C_e$ para aplicar la ecuación de Langmuir linealizada

$$\frac{1}{q} = \frac{1}{q_{max}} + \frac{1}{b \cdot q_{max} \cdot C_e}$$

donde obtenemos la ordenada al origen $1/Q_{max}$, con lo cual el Q_{max} es de 357 mg de plomo / g de biomasa bacteriana. El valor adimensional R_L es de 0,002222, por lo que se considera un comportamiento isotérmico favorable. Además, observando el R^2 de la figura 37 nos dice que los datos se ajustan en un 98,30 % al modelo propuesto.

VII.11 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA CEPA M8A-2T

La secuencia que se obtuvo en el análisis bioinformático fue:

ACAGGTGTGCCTAGTCCTCAACGAGCGCTACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCG
CCGCTAACTCATAGGAGAATGCCTAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAT
ACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGACAAGCGGACCTCATAAAGTACGTCGTAGTC
CGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGA
TCAGAAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACC
ATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTAC
CACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTACAGGGTAAACCATAGTCGGTGG
TATGGTTTTTTTTCTTTAGTGGTTATTTGTTATAGGGGGGTACATATGTTTGTGG
TGTACGGGTGATATT

Para la edición de la secuencia se usó el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* y para la identificación de la secuencia se usó BLAST (NCBI).

Para la construcción del árbol filogenético se descargaron las siguientes secuencias del BLAST (NCBI):

Serratia symbiont 242397721 gb FJ655528.1

Serratia marcescens 485099113 ref NR_102509.1

Serratia marcescens 577698320 gb FJ601708.1

Serratia marcescens 45861560 gb AY498856.1

Serratia marcescens

Serratia marcescens 534310731 gb KF528829.1

Serratia sp. 563322894 gb KF647218.1

Serratia proteamaculans 224180741 gb FJ752236.1

Serratia proteamaculans 224180741 gb FJ752236.1

Serratia ficaria 183604177 gb EU554437.1

Serratia ficaria 2209037 dbj AB004745.1

Serratia ficaria 10303326 emb AJ279054.1

Serratia odorífera 15054670 gb AF286870.1

Serratia quinivorans 15054667 gb AF286867.1

Serratia grimesii 116090698 gb DQ991163.1

Serratia grimesii 440658027 gb KC178579.1

Pseudomonas putida 453512 gb L28676.1 PSE16SRNAB

Pseudomonas syringae 429843659 gb JX876900.1

Para el alineamiento de las secuencias se usó Clustal X V2.0.10, una vez alineadas las secuencias se usó el programa Mega V6.06, para realizar el árbol filogenético de la figura 38, que se obtuvo usando la metodología de *neighborhood* con *bootstrap* de 1000, que nos confirma la identificación bioquímica previamente realizada con el sistema de identificación rápida API 20 E, donde la cepa fue identificada como *Serratia marcescens*.

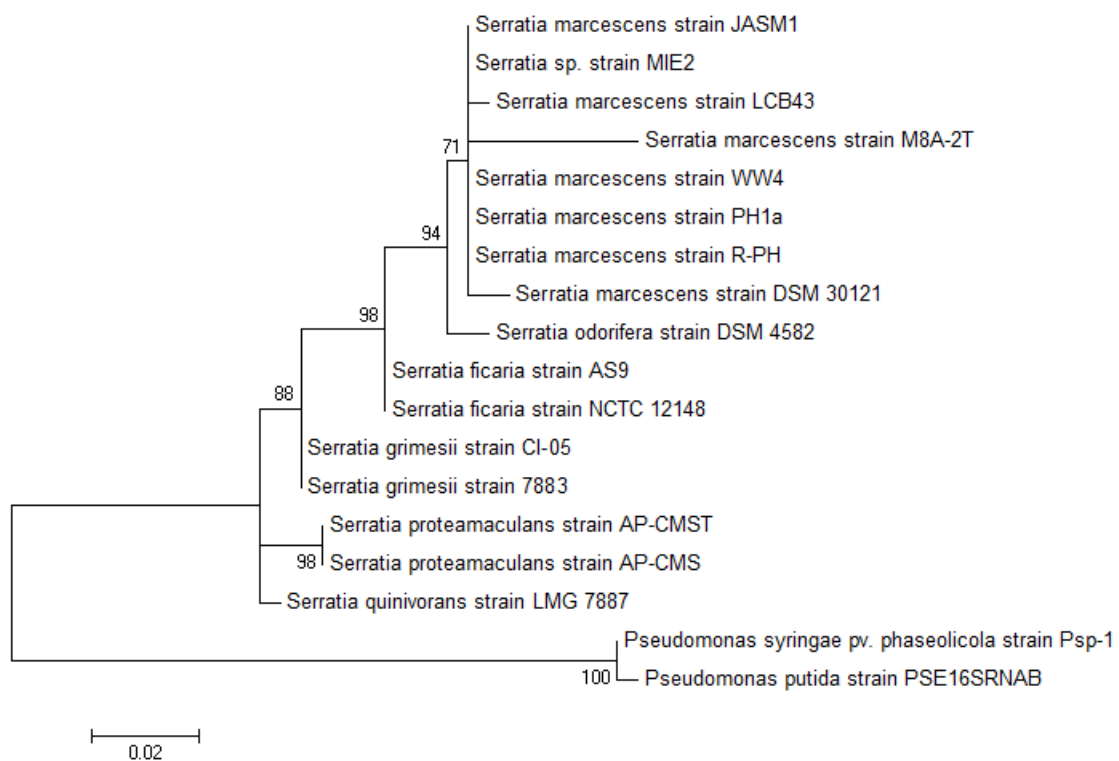


Figura 38. Árbol filogenético de confirmación de la cepa M8A-2T como *Serratia marcescens*

VII.12 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE *Serratia marcescens* M8A-2T

La micrografía electrónica del sedimento que se obtiene después de centrifugar la cepa enfrentada con el metal pesado, en este caso plomo, nos muestra la adherencia del plomo a la superficie bacteriana demostrando que el proceso de biosorción se dá en la membrana externa de la pared celular como lo exhiben las figuras 39 y 40.

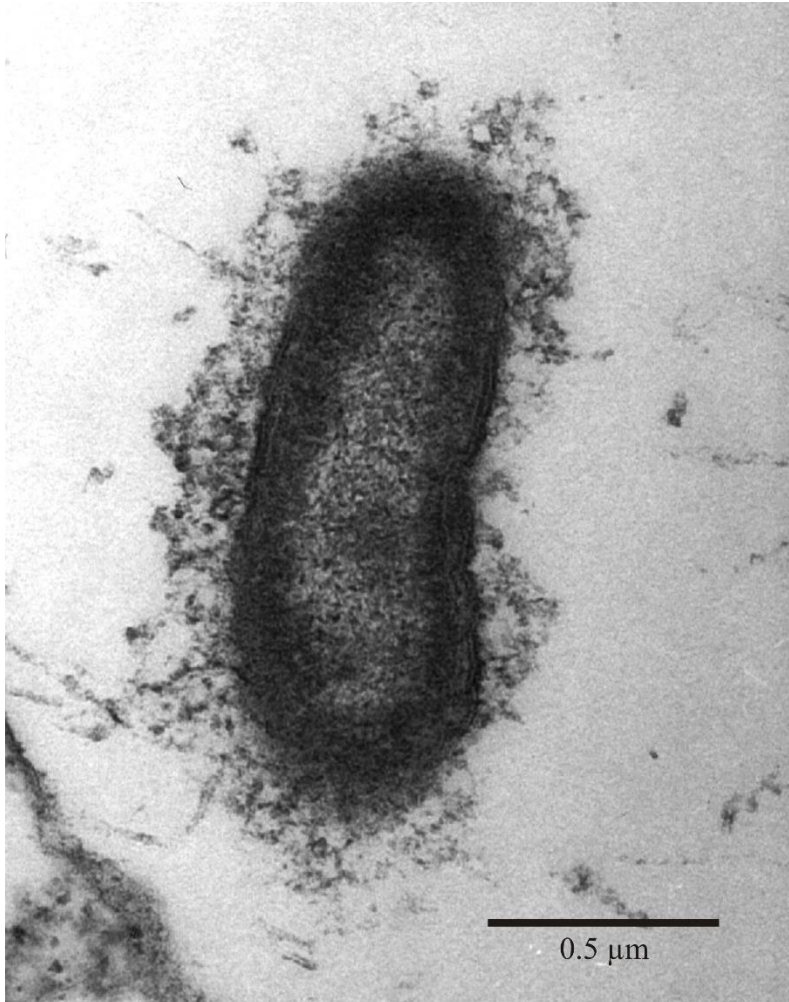


Figura 39. Micrografía electrónica de la cepa *Serratia marcescens* M8A-2T mostrando los iones de plomo adheridos a la superficie bacteriana (56000 x)

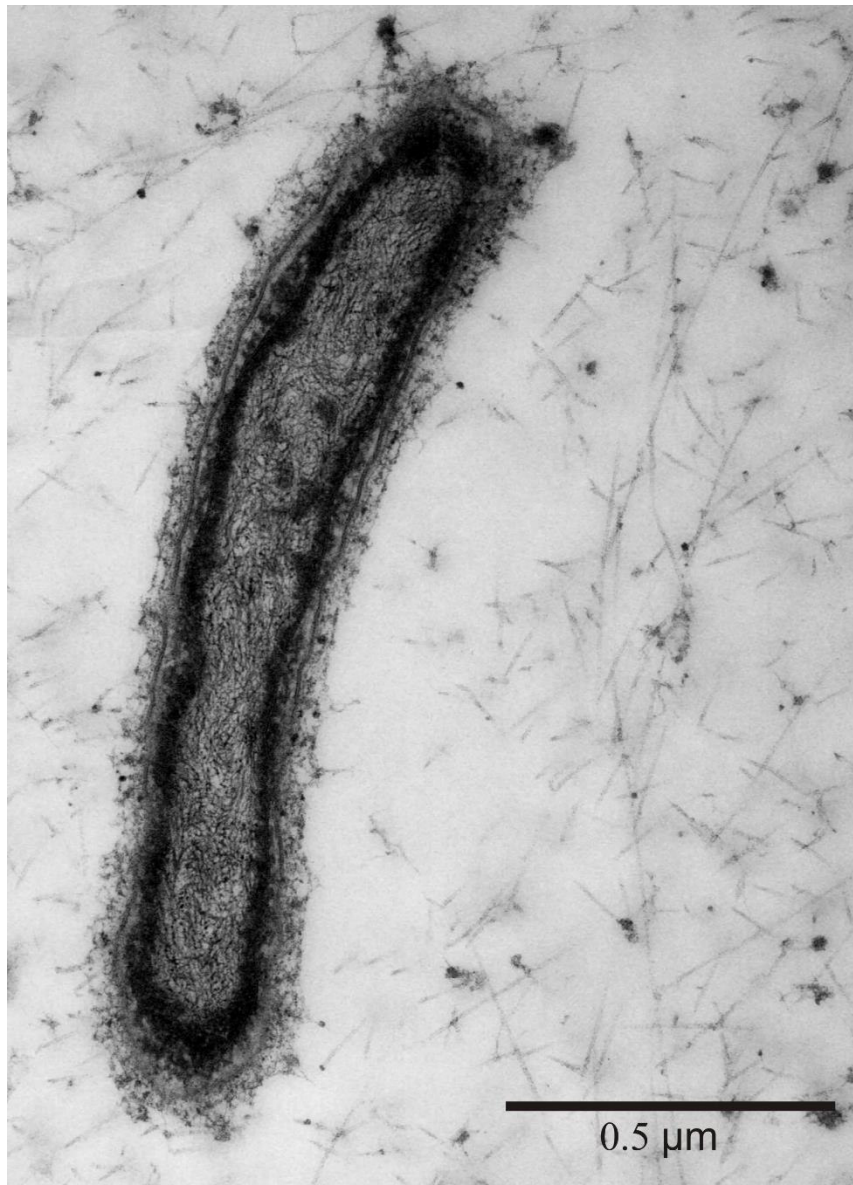


Figura 40. Corte sagital de la cepa *S. marcescens* M8A-2T donde observamos iones de plomo rodeando la membrana externa de la pared celular bacteriana (73000 x)

VIII.DISCUSION

VIII.1 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A METALES PESADOS

Usualmente se emplean cepas de microorganismos gram positivos como *Bacillus*, por la amplitud de su pared celular y también se emplean residuos agro-industriales para abaratar el proceso. Existen pocos reportes de cepas de *Serratia marcescens* resistentes a metales pesados y relacionados a biorremediación. La cepa *Serratia marcescens* C1 aislada por Marrero-Coto (2006) que es resistente a níquel y otra cepa aislada de suelos en Pennsylvania, reportado por Kurek *et al.*, (1982) donde se obtuvo un 76,20 % en la remoción de Cd (II) en un medio líquido usando biomasa muerta de la misma especie. Cuatro cepas de *Serratia* aisladas de suelos contaminados con petróleo en Bagdad por Alzubaydi (2012) que eran resistentes a metales pesados y una de ellas la S4 lograba crecer sin problemas en 1000 µg/ml de plomo, pudo remover 55 % de plomo. En nuestro país tenemos el reporte de Ballardo (2013) que logró remover 91,57 % de cadmio y 74,04 % de plomo, empleando biomasa muerta de la cepa M8A-2T, la misma que estamos presentando en este estudio con biomasa viva pero seca que puede remover de un medio acuoso hasta 99,97 % de cadmio y 96,02 % de plomo; éstos resultados nos incentivaron a ahondar más en el proceso de biosorción de la cepa y optimizar el proceso.

Pensamos que la cepa en estudio no podría remover cadmio y plomo si no tuviera algún sistema que le permita tolerar o resistir la concentración de 800 mg/ml de cadmio y 16000 mg/l de plomo que es tóxica para el resto de organismos y microorganismos, pues concordamos con Nies (1999) que solo los microorganismos que tienen sistemas genéticos para contrarrestar la acción de los metales pesados logran sobrevivir en ambientes contaminados con elevadas concentraciones de estos elementos y además con Marrero (2010), Nies (2003) y Trajanovska (1997) quienes sostienen que las cepas resisten la concentración de metales porque tienen codificados genes que les permiten mantener su homeostasis .

Al observar la corrida electroforética de las figuras 39 y 40, la cepa M8A 2T no presenta plásmidos y es un resultado poco usual pero bastante positivo pues al tener resistencia a metales codificada en el cromosoma hace a la cepa más estable genéticamente, propiedad que es un requisito para todo microorganismo que se desee emplear en biotecnología y en biorremediación; este resultado se ve apoyado por Barzanti (2007) quien propone que los genes plasmídicos generalmente están presentes en bacterias que proceden de ambientes que ocasionalmente tienen contaminación con metales pesados mientras que, las bacterias que expresan genes cromosómicos de resistencia nos indican que éstos se hicieron necesarios para su supervivencia. En este caso, la cepa fue aislada de un relave antiguo en la Sociedad Minera Condestable, que era una mina en Mala – Lima; donde se extraía cobre a partir de calcopirita y esto pudo ser el factor de selección inicial para que la cepa pueda sobrevivir en el relave minero y adquirir genes que le permitan exhibir los altos niveles de resistencia presentados en la tabla 4.

VIII.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO

Debido a la naturaleza autocatalítica del crecimiento microbiano es lógico suponer que el número de microorganismos influye en la velocidad con que aumenta la población y éste es el principal parámetro para decidir acerca de la elección de cepas para algún proceso biotecnológico. En nuestro caso escogimos la cepa con mejor velocidad de crecimiento y mayor capacidad de producción de biomasa (23 mg/ml) por ser éste nuestro interés, muy pocos trabajos en este campo hacen este tipo de selección, la mayoría solo están referidos a la resistencia de las cepas frente a los metales pesados; de tal manera que la elección de la cepa M8A-2T cumplió con estos parámetros para luego ser evaluada en cuanto a las características de biosorbente.

Si bien en la tabla 5 se puede ver que la cepa XIX tiene un μ de $0,360 \text{ hr}^{-1}$, su rendimiento en biomasa es de solo 12 mg/ml por eso no la elegimos.

VIII.3 DETERMINACIÓN DE pH ÓPTIMO

Nuestra cepa se comporta muy bien a pH ácido lo cual nos indica que la protonación que existe a ese pH es la adecuada para que los metales se adhieran a los grupos funcionales de superficie en la membrana externa de la bacteria; pero debemos tomar en cuenta lo que expresan Navarro *et al* (2006) que el cadmio comienza a convertirse en $\text{Cd}(\text{OH})^+$ a pH mayores a 5,5 y el plomo se va convirtiendo en Pb OH a pH mayores a 4 según lo reportado por Cuizano *et al* (2010) debido a la formación de aquo e hidroxocomplejos de metales pesados, que condicionan la especie química del catión en solución acuosa. Dicho comportamiento es regulado por el pH, entendido como el equilibrio entre iones hidronio y oxhidrilos en solución de tal forma que proporciona los ligandos a los que estará unido el ion metálico.

El 99,97 % de remoción de cadmio demuestra un resultado bastante notable y respecto al plomo a pH 3 se remueve 96,03% y a pH 7 donde se removió 92,46 % las diferencias son mínimas y pueden usarse ambos pH para la remoción. Para Tur-Naranjo (2013) el pH es uno de los parámetros más importantes en un proceso de biosorción pues afecta la solubilidad de los metales y a la activación de los grupos funcionales de la biomasa. Los sitios de unión más frecuentes son carboxilos, aminas, fosfatos, sulfatos e hidroxilos. El aumento de estos sitios disponibles a grupos se puede realizar mediante el desplazamiento de protones lo que está en función del pH; él encontró que cepas de *Kluyveromyces* podían remover plomo a pH que variaban entre 4,2 – 6,2; *Bacillus* a pH 4.2 y *Pseudomonas* a pH 5,2 concluyendo que el pH influye en la capacidad de adsorción de la biomasa seca de las cepas ensayadas; mientras que Hadi (2003) reportó la adsorción de 90% de cadmio en 5 minutos a pH 5 por levaduras .

Según Larenas (2008) a pH iguales o mayores a 8 el plomo precipita como hidróxido teniendo menos disponibilidad para ser retenido por el biosorbente.

Encuentra que los residuos vegetales pueden retener plomo empleando pH 6 como óptimo. Monge (2009) sostiene que a pH menores a 4 la biosorción se ve afectada pues se reduce la atracción entre biomasa y metal, ellos ejecutan un proceso de biosorción de cobre con un consorcio microbiano en un reactor continuo que a pH entre 3-4 removi6 el 94% durante 6 días, pero entre pH 4 - 5 el proceso de prolonga por 10 días y remueve el 97% del cobre.

Chowdhury (2013) encuentra una mayor retención de cadmio entre pH 8,0 y pH 10 por partículas de magnetita y lo atribuye a la disminución de la protonación y predominancia del ion Cd^{+2} y Cd OH y al hecho que la magnetita empieza a cargarse negativamente y puede captar más Cd. Meitei (2013) evaluó la capacidad de absorción de cadmio y plomo de *Spirodela polyrhiza* entre pH 2 - 6 para plomo y 2 - 7 para cadmio, para evitar la formación de hidróxidos que compiten con los sitios de sorción y reducen la retención del metal, obteniendo 0 % a pH 2,0, 57,19% a pH 3,0 y 91,77 % a pH 4,0, decreciendo a 68,00 % en pH 5.0 para plomo mientras que para cadmio obtuvo 22,39 % y a pH 6 96.76 %.

Ballardo (2013) empleando la biomasa muerta de la cepa M8A-2T obtuvo a pH 9 un 91,57 % de remoción de cadmio y un 79,92 % a pH 7. En cambio para plomo se logró remover 74,04 % a pH 9 y 73,64 % a pH 7 lo que sugiere que no existe una variación significativa entre valores de pH de 7 y 9 para el caso de plomo, mientras que para el cadmio sí. Además nos muestra una diferencia en la capacidad de sorción de la biomasa viva seca y la biomasa muerta respecto al pH indicando que los sitios ligandos son diferentes en la biomasa viva; donde los grupos OH^- de los LPS van a estar dispuestos a interactuar con la carga positiva de los metales pesados.

VIII.4 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE ENFRENTAMIENTO

Nuestra cepa captura metales en tiempo cortos de contacto ya que a los 15 minutos de enfrentamiento con los metales hay un 91,7 % de remoción de cadmio y 77,58 % de remoción de plomo, esto puede deberse al pH óptimo en el que se corre

la experiencia, a la concentración apropiada de biomasa y metal lo cual está respaldado por Atkinson *et al.*, (1998) quienes mencionan que la cinética de adsorción en la superficie bacteriana presenta un equilibrio rápido siendo en promedio de 5 – 30 min. Otros autores difieren de nuestros resultados porque cada microorganismo tiene una carga neta de superficie y composición particular que tienen influencia en la avidez por unirse al metal pesado o catión. Por ejemplo, Chowdhury (2013) estudió la cinética de adsorción de cadmio con nanopartículas de hematita variando la concentración de biosorbente y el tiempo entre 10 - 140 minutos y encontró que la capacidad de sorción aumentó rápidamente hasta el 75 % durante los primeros 60 minutos empleando 0,8 g de sorbente pero recién alcanza el equilibrio a los 120 minutos empleando 1,5 g de biosorbente. Meitei (2013) con polvo de *Spirodela* obtuvo 80,27 % de adsorción de plomo y 94,08 % de adsorción de cadmio en 5 minutos, a los 120 minutos 91,74 % de adsorción para plomo y 96,76 % de adsorción para cadmio, sin encontrar un incremento significativo con el incremento del tiempo de enfrentamiento.

VIII.5 EFECTO DE LA CONCENTRACION INICIAL DE CADMIO Y PLOMO SOBRE LA CAPACIDAD DE BIOSORCIÓN

La capacidad de remoción de nuestra cepa tiene un comportamiento directamente proporcional a la concentración inicial del metal a medida que se va aumentando la concentración de cadmio o plomo ; la biomasa seca capta más metal porque hay más cantidad de metal que rápidamente pueden reaccionar con las cargas negativas de la superficie bacteriana; estos resultados difieren con lo obtenido con otros autores como Sai Subashini *et al* (2013), quien estudiando la capacidad de biosorción de *K. marxianus* encuentra que la capacidad de remoción de plomo disminuye conforme aumenta la concentración inicial de plomo pues en una concentración de 100 ppm remueve 94,02 % mientras que a 500 ppm solo consigue retener 33,4 mg/g; asimismo Ballardo (2013) luego de una hora de interacción entre la biomasa muerta de *Serratia marcescens* M8A-2T y la solución metálica de Cd (II) a pH 9, observó que a una concentración de 400 mg/L, presentó hasta un 99.89 % de captación. En tanto que para Pb a 100 mg/L se obtuvo un

61,32 % y fue decreciendo según se fue aumentando la concentración del metal. En tanto concordamos con otros investigadores como Barka *et al* (2013) quienes obtienen que la remoción de cadmio y plomo, con biomasa seca de cactus con partículas menores a 100 μm , es dependiente de una concentración inicial elevada de metales y lo atribuye a la mayor fuerza iónica para la transferencia de masas postulando que las concentraciones elevadas de iones metálicos ocupan rápidamente los sitios de unión en la superficie del sorbente.

Meitei (2013) reporta haber empleado entre 100-160 mg de concentración inicial de plomo y haber logrado una remoción de 92,25 % a 77,61 % y cuando empleó de 10 a 40 mg para cadmio obtiene un descenso en la remoción de 96,76 % a 69,16 %.

VIII.6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE BIOMASA

En realidad la capacidad de retención de metales pesados que demuestra la biomasa seca de la cepa M8A-2T, es notable pues a la concentración de 1 mg/ml logra remover 99,96 % de cadmio y 93,93 % de plomo, otros investigadores optimizan su proceso de remoción con mayores concentraciones y nuevamente atribuimos este resultado a la naturaleza química de la superficie bacteriana de una bacteria gramnegativa como *Serratia marcescens* compuesta por el lipopolisacárido en la membrana externa y al pH en que se llevó a cabo la experiencia.

Además, debemos remarcar que 1 mg/ml es una cantidad menor comparada con la empleada por otros investigadores como Barka (2013) quien obtiene un incremento significativo al aumentar la concentración de la biomasa de 0,5 a 4 g/l, pero cuando aumenta de 4 a 10 g/l el aumento de la capacidad de remoción no es notable ni significativo.

Meitei (2013) con biomasa seca de *Spirodela* y tamizada con tamiz de 100 mesh, en concentraciones que van de 0,05 - 0,25 g obtiene un incremento de 80,05 % a 93,28 % en una solución de 100 ppm de plomo y para cadmio en solución a 10 ppm obtiene una captación de 95,39 % a 97,97 %.

VIII.7 EFECTO DE LA GRANULOMETRÍA EN LA CAPACIDAD DE BIOSORCIÓN

Los gránulos pequeños por presentar mayor superficie de interacción con el exterior resultan ideales en este proceso donde empleamos la biomasa seca de *Serratia marcescens* M8A-2T pues remueven 38,8 % de cadmio y 55,99 % de plomo concordando con otros autores como Barka *et al* (2013) que empleando biomasa seca de cactus en tamaños que variaban entre $< 100 \mu\text{m}$ y entre $100 - 500 \mu\text{m}$, encontraron que el tamaño de la partícula tiene una ligera influencia en la capacidad de biosorción; las partículas menores a $100 \mu\text{m}$ aumentaban la capacidad de biosorción, debido a que estas partículas presentan mayor área superficial de contacto con el exterior. Chowdhury (2013) trabajó con partículas de magnetita que tenían un tamaño entre 20 - 60 nm y logró remover hasta el 90 % de cadmio en solución.

VIII.8 DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE EQUILIBRIO

Pocos son los estudios con microorganismos que llegan a estudiar el modelo cinético de la biosorción, por eso hemos tomado como patrones de comparación algunos estudios realizados con biomasa seca con partículas de tamaño semejante a la biomasa seca de *Serratia marcescens* M8A-2T. Así, Larenas (2008) empleando residuos lignocelulósicos obtiene un Q_{max} de 182 mg de plomo / g de biosorbente y alcanza la saturación entre 15 y 30 minutos con soluciones diluidas. Sai (2013) ajustando sus resultados con el modelo de Langmuir con *Kluyveromyces marxianus* encuentra que su Q_{max} es 3,6 mg de plomo/0,1g de biomasa seca de la levadura y 66 g de plomo con la levadura inmovilizada en alginato. Burka *et al* (2013) con biomasa seca de cactus y empleando el modelo de Langmuir encontraron una capacidad máxima de retención de 30,42 mg de cadmio/g sorbente y 98,62 mg de plomo/ g de sorbente. Chowdhury (2013) con nanopartículas de magnetita a una

concentración 0,8 g logró un Q_{\max} de $2,7\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, y su modelo también se ajustó a las isotermas de Langmuir.

Los resultados de Meitei (2013) con polvo de *Spirodela* cumplen el modelo de Langmuir y obtiene una Q_{\max} de $137\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para plomo y $36\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para cadmio, implicando que la biomasa tiene una superficie suave con energía uniforme y la adsorción tiene lugar en una monocapa sin interacción entre los iones adsorbidos. En el presente trabajo, con biomasa seca de *Serratia marcescens* M8A-2T se ha logrado una capacidad de retención máxima de 417 mg de cadmio/g de biomasa y 357 mg de plomo/g de biomasa, resultados bastante alentadores porque la saturación de ligandos se alcanza en 15 minutos para cadmio y entre 15 y 30 minutos para plomo; haciendo que esta biomasa sea una de las que mejor capacidad de retención muestra de acuerdo a lo reportado por Wang (2009).

VIII.9 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La micrografía electrónica de la cepa de *Serratia marcescens* M8A-2T nos demuestra que los sitios de unión de los metales se encuentran en la membrana externa de la pared celular de la célula bacteriana pues es allí donde se notan los gránulos oscuros del plomo, Diels (1995) obtuvo una micrografía electrónica semejante con gránulos de plata en superficie a partir de una cepa de *Pseudomonas mendocina* AS302 que adsorbe metales pesados sin ninguna especificidad y otra micrografía con *Alcaligenes eutrophus* ER 121 absorbiendo iones de plata en el exopolisacárido de la cepa, Diels (1995); la diferencia está en el grado de dispersión que se observa en los gránulos absorbidos.

IX. CONCLUSIONES

1. Se logró optimizar un proceso de bioadsorción de cadmio y plomo con la biomasa seca de *Serratia marcescens* M8A-2T, aislada de un ambiente minero, resistente a éstos metales y con la mayor producción de biomasa; a nivel de laboratorio.
2. La máxima capacidad de bioadsorción se obtuvo bajo las siguientes condiciones: pH 3, 1 mg/ml de biomasa con granulación menor a 50 μm y 15 minutos de tiempo de enfrentamiento con el metal.
3. La biomasa seca de la cepa en estudio demuestra una capacidad de retención máxima (Q_{max}) muy superior a la encontrada por otros grupos de investigación, a los 15 minutos de enfrentamiento con soluciones cadmio y plomo.
4. La cepa es genéticamente estable, al no presentar plásmidos hay un menor riesgo de perder la resistencia a metales pesados.

X. RECOMENDACIONES

1. La metodología de optimización del proceso de bioadsorción de cadmio y plomo con la cepa *Serratia marcescens* M8A-2T puede emplearse como protocolo para la optimización de procesos similares con otros metales.
2. Los resultados obtenidos deben servir para aplicaciones directas *in situ*, previo escalamiento a nivel piloto.
3. Se necesita profundizar en el conocimiento del comportamiento de las diversas especies de metales en el subsuelo así como de las moléculas involucradas en el proceso de captación de metales.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLURI, H. K., S. R. Ronda, V. S. Settalluri, J. S. Bondili, V. Suryanarayana, and P. Venkateshwar. *Biosorption: An eco-friendly alternative for heavy metal removal*. *Afr. J. Biotechnol.* 2007 6:2924–2931.

ALONSO R.. *Métodos fenotípicos y genotípicos de análisis intraespecífico en Serratia marcescens*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. España.1991

ALZUBAIDY SK. *The resistance of locally isolated **Serratia marcescens** to heavy metals chlorides and optimization of some environmental factors*. *J Environ Occup Sci.* (2012), [cited December 09, 2014]; 1(1): 37-42. [doi:10.5455/jeos.2012060510450](https://doi.org/10.5455/jeos.2012060510450)
Appl. Microbiol. 1974. 28. 513.

ANDERSEN KJ, Lundgren DG. *Enzymatic studies of the iron-oxidizing bacterium, Ferrobacillus ferrooxidans: evidence for a glycolytic pathway and Krebs cycle*. *Can Journal Microbiol*, 1969.15(1):73–79.

ATKINSON, B.W.; BUX, F. & KASAN, H.C. *Considerations for application of biosorption technology to remediate metal-contaminated industrial effluents*. *Water SA*. 1998. 24(2):129–36.

BALLARDO,C. *Evaluación de la capacidad de bioadsorción de Cadmio(II) y Plomo(II) mediante el uso de biomasa bacteriana muerta*. Tesis para optar al título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga. UNMSM. 2013

BARKA Nouredine Abdennouri, M El Makhfouk,M , Samir Qourzal. *Biosorption characteristics of cadmium and lead onto eco-friendly dried cactus (Opuntia ficus indica) cladodes* *Journal of Environmental Chemical Engineering* 1 (2013) :144–149

BARZANTI R, Ozino F, Bazzicalupo M, Gabbrielli R, Galardi F, Gonnelli C, Mengoni A. Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microb Ecol.* 2007;53(2):306-16

BERGLUND,M., A. Akesson, B. Nermell, and M Vahter. *Intestinal absorption of dietary cadmium in women depends on body iron stores and fiber intake.* *Environ Health Perspect.* Dec 1994; 102(12): 1058–1066.

BRUINS MR, Kapil S, Oehme FW. *Microbial resistance to metals in the environment.* *Ecotoxicol Environ Saf.*2000;45:198–207.

CAÑIZARES-VILLANUEVA R.O *Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana.* *Rev. Latinoam Microbiol.* 42: 131-143.2000.

CARRINGTON, C.D. y Bolger, P.M.; An assessment of the hazards of lead in food, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 16 (3) :265-272 .1992.

CHOWDHURY S.R., E.K. Yanful. *Kinetics of cadmium (II) uptake by mixed maghemite-magnetite nanoparticles.* *Journal of Environmental Management* 129 (2013) 642- 651.

CLARKSON, T.W.; Nordberg, G.F. Y Sager, P.R.; *Reproductive and Developmental Toxicity of Metals*, Plenum Press, New York, USA 1983.

COPELAND, R.A.; *Non-destructive neutron activation analysis of environmental samples*,In: Proc. 161 Annu. Meet., American Chemical Society, Washington, USA 1971.

CORTUELO, L.; MARQUÉS M. D. *Los metales pesados en las aguas (I), su origen. Acción de agentes biológicos.* *Ingeniería Química.* 31 (356) p. 263-266, 1999.

CROIZE, J & LcNoc, P. *Fréquence Actuelle des Différentes Espèces de Serratia costelvtza zealandica.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1988. 38. 1. 1.

CRUZ,D. *Remoción de metales por microorganismos productores de polisacáridos*
Tesis para obtener Grado de Maestría en Tecnología avanzada. 2008. Instituto
Politécnico Nacional. Querétaro México

CUIZANO, Norma A. U.Reyes, S.Dominguez, B.Llanos y A. Navarro. *Relevancia del
pH en la adsorción de iones metálicos mediante algas pardas. Rev. Soc. Quím. Perú*
[online]. 2010, vol.76 (2) [citado 2014-12-09], pp. 123-130. Disponible en:
[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-
634X2010000200002&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2010000200002&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 1810-634X.

DICK,R.E; Boswell,C.D and L.E. Macaskie. *Uranyl phosphate accumulation by
Acinetobacter spp.* Biohydrometallurgical Processing.Vol.II. Edited by C.A Jerez, T.
Vargas, H. Toledo and J.V.Wiertz. University of Chile,1995.

DIELS,L.,M. Tsezos,T. Pumpel et al. *Pseudomonas mendocina AS302 a bacterium
with non selective and very high metal biosorption capacity.* Biohydrometallurgical
Processing.Vol.II. Edited by C.A Jerez, T. Vargas, H. Toledo and J.V.Wiertz.
University of Chile,1995.

DIELS,L.,P. Corbisier,L. Hooyberghs, et al. *Heavy metals resistance and biosorption
in Alcaligenes eutrophus ER121.* Biohydrometallurgical Processing.Vol.II. Edited by
C.A Jerez, T. Vargas, H. Toledo and J.V.Wiertz. University of Chile,1995.

DIN, G.A , Suzuki I. *Mechanism of Fe cytochrome c reductase of Ferrobacillus
ferrooxidans.* Can, Journal Biochemistry,1967. 45(10):1547-1556.

DOYLE, R.J. ; Matthews T. H. ; Streips, U. N. *Chemical basis for selectivity of metal
ions by the Bacillus subtilis cell wall.* Journal Bacteriology, 143:471-480. 1980.

ELINDER, C.-G.; *Other toxic effects, En: Cadmium and Health: a toxicological and
epidemiological appraisal* Vol II. Effects and Response, Boca Raton, CRC Press,
1986.

EWING, W.H.; Davies, B.R. & Fife, M.A. *Biochemical Characterization of Serratia liquefaciens and Serratia rubidea*. 1972. Center for Disease Control, Atlanta.

FASSET, D.W. *Cadmium*. In Waldron H.A. (Eds.). *Metals in the environment*. Academic press. London. 1980. 61-110

FRIEDMAN, B. A., Dugan, P. R. *Concentration and accumulation of metallic ions by the bacterium Zoogloea*. *Development Industrial Microbiology*, 1968.9:381-388.

GASTON, M.A. & Pitt, T.L. *O—Antigen Specificities of the Serotype Strains of Serratia marcescens*. *J. Clin. Microbiol.* 1989.27.12.2697

GAUGHRAN, E.E.L. *From Superstition to Science: The History of a Bacterium*. *Trans NY.Acad.Sci.* 1965.313

GILFILLAN, S.C. Lead poisoning and the fall of Rome. *Journal of Occupational Medicine*. 1965. 7: 53-60

GONZALEZ, M. H., G. C. L. Araujo, C. B. Pelizaro, E. A. Menezes, S. G. Lemos, G. B. De Sousa, y A. R. A. Nogueira. *Coconut coir as biosorbent for Cr(VI) removal from laboratory wastewater*. *J. Hazard. Mater.* 2008. 159:252–256.

GÓMEZ, A.; Villalba, A.; Acosta, G.; Castañeda, M. & Kamp, D. Metales pesados en el agua superficial del Río San Pedro durante 1997 y 1999. *Rev. Int., Contam. Ambient.* 2004; 20(1)5-12.

GRAEME, K.A. y Pollack, C.V.; *Heavy metal toxicity, part II: lead and metal fume fever*, *The Journal of Emergency Medicine*, 16 (2), 171-177 (1998).

GRIMONT, P.A.D. & Grimont, F. *The Genus Serratia*. *Ann. Rev. Microbiol.* 1978.32.221

GRIMONT, P.A.D.; Jackson, T.A.; Ageron, E & Noonan, M. *Serratia entomophila sp.nov. Associated with Amber Disease III tire New Zealand Grass Costelvtira zealandica*. *Int. J.Syst. Bacteriol.* 1988.38.1.1.

GROVE, D.C., and Randall W.A. *Assay Methods of antibiotics*. Medical Encyclopedia, N.Y, 1955

GUTIERREZ, S. *Flora heterotrófica acompañante de Thiobacillus ferrooxidans*. Tesis para optar al grado de Magister en Microbiología. 1998. UPG Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima Perú.

GUTIÉRREZ, S.; Merino, F.; Manrique, Y.; Ballardo, C.; Terán P.; Paredes E.; Meza C. & Castañeda E. *Evaluación de la resistencia a metales pesados de los microorganismos aislados en la mina de la sociedad minera Condestable*. En: XX Reunión Científica ICBAR de la Facultad de Ciencias Biológicas. 2011; 119.

HADI B, MARGARITIS A, Berruti F and Bergougnou M. *Kinetics and equilibrium of cadmium biosorption by yeast cells of Saccharomyces cerevisiae and K. fragilis*. Int. J. Chem Reactor 1:1-16 2003

JARUP, L.; Berglund, M.; Elinder, C.G.; Nordberg, G. y Vahter, M.; *Health effects of cadmium exposure: a review of the literature and a risk estimate, Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, **24** (suppl 1), 1-51 (1998).

KLEIN, M.; Namer, R.; Harpur, E. y Cobin, R.; *Earthenware containers as a source of fatal lead poisoning: case study and public health considerations*, New England Journal of Medicine, **283**, 669 (1970).

KRIEG, N.R. & Holt, J.G. Eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1

KUREK E., Czaban J., & Bollag J. *Sorption of cadmium by microorganisms in competition with other soil constituents*. Applied and Environmental Microbiology. 1982; 43(5): 1011-1015.

LANDRIGAN, P.J.; *Lead in the modern workplace*, American Journal of Public Health, 80 (8), 907-908 (1990).

LARENAS, C., Andrango M., Inga P. *Estudio isotérmico de biosorción de plomo en aguas utilizando residuos vegetales.* © Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador. La Granja 8(2): 3-8. 2008.

LEUNG, W.C; Chua, H. & Lo, W. Biosorption of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2001;22(6):72–5.

LOVLEY D.R. *Environmental Microbe-Metal Interactions*. Ed. American Society for Microbiology. Washington D.C. 2000.

MARRERO-COTO, J., Díaz-Valdivia, A y Coto-Pérez O. *Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación*. Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 41, No. 1, pp. 67-78, 2010.

MATURRANO, A. *Participación de microorganismos heterotróficos en procesos de lixiviación bacteriana*. Tesis para optar al título de Biólogo con mención en Microbiología y Parasitología. UNMSM. 1996.

MARTÍN M^a Ángeles. *Caracterización y aplicación de biomasa residual a la eliminación de metales pesados*. Tesis Doctoral. Junio de 2008 Universidad de Granada Facultad de Ciencias. Dpto de ingeniería Química

MEITEI, M.N.V. Prasad. *Lead (II) and cadmium (II) biosorption on Spirodela polyrhiza (L.) Schleiden biomass*. Journal of Environmental Chemical Engineering 2013 1:200-207.

MEJÍA Sandoval, Gregory. *Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos* Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia 1 (1):77-99. 2006

MELMAN, S.T.; Nimeh, J.W. y Anbar, R.D.; *Prevalence of elevated blood lead levels in an inner-city pediatric clinic population*, Environmental health perspectives. 1998. 106 (10):655-657 .

MINSA- Ministerio de Salud, Perú.: Estudio de Niveles de Plomo en la Sangre de la Población en la Oroya 2000 – 2001. 2001

MONGE O,J. Valenzuela, E.Acedo,T. Certucha, J.Almendariz. *Efecto del pH en la biosorción de cobre por bacterias aerobias. México. Biotecnología* 13(2):24-47.2009

NASRUDDIN, A.; *Biosorption of ions zinc from its aqueous solution using tempe*, Ph.D. Thesis, Department of Chemical Engineering, University of Sains Malaysia, Malaysia (2002).

NAS/NRC; *Measuring Lead in Exposure in Infants, Children, Other Sensitive Populations*, National Academies Press, Washington, USA (1993).

NAVARRO , A., K. Ramos, K. Campos, H. Maldonado . *Elucidación del efecto del pH en la adsorción de metales pesados mediante biopolímeros naturales, cationes divalentes y superficies activas* . Revista Iberoamericana de polímeros. 7 (2):113-126 marzo 2006.

NEEDLEMAN, H.L.; Riess, J.A.; Tobin, M.J.; Biesecker, G.E. y Greenhouse, J.B.; *Bone lead levels and delinquent behavior*, The Journal of the American Medical Association, 1996. 275 (5), 363-369.

NIES DH, Silver S. *Microbial heavy-metal resistance*. Appl. Microbiol Biotechnol. 1999; 51:730-50.

NIES DH. *Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes*. FEMS Microbiol Rev. 27:313-39. 2003

NINA,Meyla. “Evaluación de los métodos químico y biogénico para el tratamiento de drenaje ácido de mina a escala de laboratorio caso: mina cerro de pasco”.Tesis para optar el grado de: Magíster en Ciencias Ambientales con mención en: Desarrollo Sustentable en Minería y Recursos energéticos. 2008. UPG.Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica .UNMSM.

NORDBERG, G.F.; Kjellström, T. y Nordberg, M.; *Kinetics and metabolism, En: Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal*, vol I. Exposure, Dose and Metabolism, Friberg, Elinder, Kjellström and Nordberg (Eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 103-178 (1985).

NORDBERG, G.F.; *Human biomonitoring of trace elements: continued need for critical evaluation*, *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, **22** (5), 321-324 .1996.

OCHIAI, E.-I.; *Toxicity of heavy metals and biological defense*, *Journal of Chemical Education*, **72** (6), 479-485 (1995).

PALOMINO, Paredes y Villanueva . *Bioremediación de Drenajes Ácidos de Mina (DAM) mediante el sistema de humedales*. 2004. IV Congreso Internacional de Medio Ambiente en Minería y Metalurgia, 13-16 de Julio del 2005.

PIRKLE, J.L.; Kaufmann, R.B.; Brody, D.J.; Hickman, T.; Gunter, E.W. y Paschal, D.C.; *Exposure of the U.S. population to lead, 1991-1994. Environmental Health Perspectives*. 1998. 106 (11), 745-750.

PNUMA Programa de las naciones unidas para el medio ambiente. *Estudio sobre los posibles efectos en la salud humana y el medio ambiente en América Latina y el Caribe del comercio de productos que contienen cadmio, plomo y mercurio*. 2010. 200p

POMA, Pedro. *Intoxicación por plomo en humanos*. Anales de la Facultad de Medicina 69 (2) junio 2008.

ROSEN J.F.; *Health effects of lead at low exposure levels*, *American Journal of Diseases of Children*, 1992 146 (11), 1278-1281.

RODRIGUEZ Maria ,Rosa Miranda , Rolando Olivas y César Sosa. *Efectos de las Condiciones de Operación Sobre la Biosorción de Pb^{2+} , Cd^{2+} y Cr^{3+} en Solución por *Saccharomyces cerevisiae* Residual*. Información Tecnológica Vol. 19 (6) 2008 47p.

SAI Subashini, M. Velan ,Y S. Kaliappan. *Biosorption of lead by Kluyveromyces marxianus immobilized in alginate beads*. Journal of Environmental Biology. 34:831-835 Septiembre 2013

SILVER, S.; Phung, L. T. *Bacterial heavy metal resistance: New Surprises*. Annual Review Microbiology, 50:753-789. 1996.

SOTO C., S. Gutiérrez, A.Rey-León, E. González-Rojas. *Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo*. NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas - Vol.8 No. 14 2010: 121 240p.

SUBLET, R.; Simonnot, M.O.; Boireau, A. y Sardin, M.. *Selection of an adsorbent for lead removal from drinking water by point-of-use treatment device*, Water Research, 2003.37 (20), 4904-4912.

SYLVIA D, Hartel P, Fuhrmann J, Zuberer D. *Principles and applications of soil Microbiology*. 2°ed. Pearson Prentice Hall. 2005.

TAKENAKA,S. , Oldiges H, König H.*et al* . *Carcinogenicity of cadmium chloride aerosols in W rats* . Journal of the National Institute of Cancer .1983.70(2):367-373

TRAJANOVSKA S, Britz ML, Bhavé M. *Detection of heavy metal ion resistance genes in Gram-positive and Gramnegative Bacteria isolated from a lead-contaminated site*. Biodegradation. 1997; 8(2):113-4.Trans NY Acad Sci. 1965. 31. 3.

TUR-NARANJO, E; Orberá, T; Romagosa, Y., y Pérez, R. *Bioadsorción de plomo (II) por biomasa microbiana seca : Efecto del pH*. Revista Cubana de Química. 2013, XXV (1): 75-81

USEPA. *Air Quality Criteria for Lead*. Vols I-IV EPA 600/8-83/02aF, US Environmental Protection Agency, Washington, USA (1986).

VELANDIA Johanna. *Validación del método analítico para la cuantificación de Bacitracina en el laboratorio de control de calidad de una Industria Farmacéutica*

veterinaria .Trabajo de grado para adoptar al título de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana .Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá. Colombia 2008 .P.49

VILLACHICA, Carlos; Llamosas Jaime y Villachica Joyce; *Proceso NCD “Tecnología Nacional comprobada para el tratamiento de efluentes ácidos mineros”* SMALLVILL S.A.C. – CONSULCONT S.A.C., IV Congreso Internacional de Medio Ambiente en Minería y Metalurgia, 13-16 de Julio del 2005.

VOLESKY, B. *Removal and recovery of heavy metals by biosorption. In Biosorption of Heavy Metals*; Volesky, B., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1990; 7-44.

VOLESKY, B.; Holan R, Z. *Biosorption of heavy metals*. Biotechnology Progress. 11, 235-250. 1995.

VOLESKY, B.; *Sorption and Biosorption*. Editor: B. Volesky (2003).

VON GRAEVENITZ, A.; Rubin, S.J. *The Genus Serratia*. CRC Press. 1980.Boca Raton. Florida.

YAN, G. & Viraraghavan, T. Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucorrouxii*. *Water Research*. 2003;37(18):4486–96.

WANG, J. & Chen, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*. 2009;27(2):195–226.

WHO/IPCS; *Environmental Health Criteria Document 134 Cadmium*. Geneva: WHO.1992.

WONG, K. K., C. K. Lee, K. S. Low, and M. J. Haron. *Removal of Cu and Pb by tartaric acid modified rice husk from aqueous solutions*. Chemosphere . 2003; 50: 23–28.

XU, G.; Zhou, G.; Jin, T.; Zhou, T.; Hammarstrom, S.; Bergh, A. y Norberg, G.;

Apoptosis and p53 gene expression in male reproductive tissues of cadmium exposed rats, Biometals, 1999. 12 (2): 131-139

ZHOU, T.; Zhou, G.; Song, W.; Eguchi, N.; Lu, W.; Lundin, E.; Jin, T. y Nordberg, G.;
Cadmium-induced apoptosis and changes in expression of p53, c-jun and MT-Igenes in testes and ventral prostate of rats, Toxicology, 1999. 142 (1): 1-13 .